Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie
und Röntgendiagnostik der Universität in Marburg
Direktor: Prof. Dr. F. Heß

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN SIALINSÄUREGEHALT IM SERUM VON TUMORPATIENTEN UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DES BRONCHIALCARCINOMS

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

KLAUS REINER
aus Tübingen

Marburg 1979

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie
und Röntgendiagnostik der Universität in Marburg
Direktor: Prof.Dr.F.Heß

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN SIALINSÄUREGEHALT IM SERUM VON TUMORPATIENTEN UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DES BRONCHIALCARCINOMS

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

KLAUS REINER

aus Tübingen

Marburg 1979

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 20. April 1979
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Dekan: Prof. Dr. Friedrich Neurath
Referent: PD. Dr. Rolf Prignitz
Correferent: Prof. Dr. Dr. Hans-Jürgen Hering

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	5
I.1 Chemie der Sialinsäuren	5
I.2 Vorkommen der Sialinsäuren	6
I.3 Sialinsäuren als Bestandteile von Glykoproteinen	6
I.4 Struktur der Glykoproteine	7
I.5 Biosynthese der Glykoproteine	8
I.6 Abbau der Glykoproteine	10
I.7 Eigenschaften der Glykoproteine	12
I.8 Biologie der Glykoproteine	20
I.9 Rolle der Sialinsäuren bei Tumorentstehung und Tumorwachstum	22
II. Material und Methoden	27
II.1 Patienten	27
II.2 Sialinsäure-Test	28
II.3 Statistik	32
III. Ergebnisse	33
III.1 Kontrollen	33
III.2 Patienten mit Bronchialcarcinom	34
III.3 Nicht-maligne Lungenerkrankungen	38
III.4 Patienten mit anderen malignen Erkrankungen	39
IV. Diskussion	43
V. Zusammenfassung	51
VI. Literaturverzeichnis	53

Vorwort

Das Thema der vorliegenden Dissertation verdanke ich Herrn Privatdozent Dr. Rolf Prignitz. Er hat mir während der Untersuchungen und deren Auswertung von Mai 1977 bis Februar 1979 jederzeit mit seinem Rat zur Seite gestanden. Dafür möchte ich mich an dieser Stelle bedanken.
Mein Dank gebührt auch meinem klinischen Lehrer, Herrn Professor Dr. Dr. Hans-Jürgen Hering, der sich freundlicherweise bereit erklärt hat, das Correferat zu übernehmen.

Marburg, im Februar 1979 Klaus Reiner

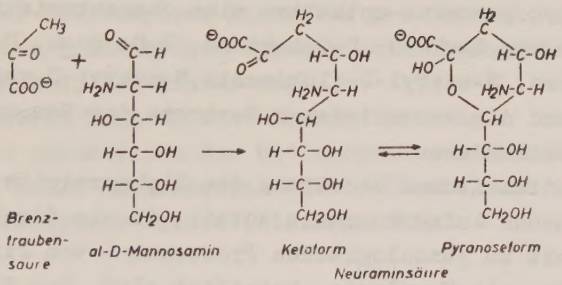
- Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet -

I. EINLEITUNG

I.1 Chemie der Sialinsäuren

Die Neuraminsäure gehört zur Gruppe der Sialinsäuren, die ihrerseits substituierte Neuraminsäurederivate sind: N-acetyl-, N-glycolyl- und N,O-diacetylneuraminsäure. Sie ist, neben Glukosamin und Galaktosamin, ein Aminozucker, der formal durch Ersatz einer Hydroxylgruppe durch eine Aminogruppe entsteht (10, 68).
Die Struktur der Neuraminsäure (NS) kann folgendermaßen abgeleitet werden:
Mannosamin (an C-2 epimer zu Glukosamin) ist mit Brenztraubensäure nach dem Prinzip der Aldolkondensation verbunden (Abb.1).

Abb.1
Struktur der Neuraminsäure (nach KARLSON, 68).



Die entstandene Hydroxylgruppe orientiert sich in trans-Stellung zur Aminogruppe. Die Ketogruppe der Brenztraubensäure bildet einen (pyranoiden) Halbacetalring aus.

I.2 Vorkommen der Sialinsäuren

Die Sialinsäuren kommen in einer großen Zahl von Geweben, Körperflüssigkeiten (126) und Bakterien (136) vor. Ein Großteil dieser Kohlenhydrate in tierischem Gewebe ist in konjugierter Form mit kovalenten Bindungen an Proteine (Glykoproteine) oder Lipide (Glykolipide) gebunden. Die letzteren liegen als saure Glykolipide (Ganglioside = sialinsäurehaltige Glykosphingolipide) oder neutrale Glykolipide (= Asialoglykosphingolipide) vor (35,123).

I.3 Sialinsäuren als Bestandteile der Glykoproteine

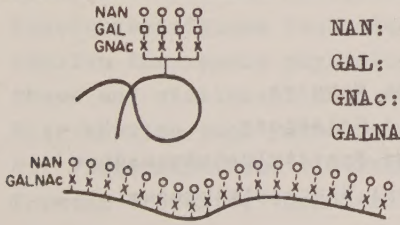
Die Glykoproteine sind Bestandteile vieler Substanzen von biologischer Bedeutung, wie: Enzyme, Hormone,Antikörper und Membranen. Kollagen, wichtigstes Strukturprotein des Körpers,ist ein Glykoprotein, ebenso die Vielzahl kohlenhydrathaltiger Proteine in mukösen Sekreten.
Die Glykoproteine enthalten eine charakteristische Gruppe von Zuckern: D-Galaktose, D-Mannose, D-Glucose, L-Fucose, N-acetyl-D-glukosamin,N-acetyl-D-galaktosamin und die verschiedenen Derivate der Neuraminsäure: die Sialinsäuren.
Der medizinischen Bedeutung der Glykoproteine wurde zunehmende Aufmerksamkeit zuteil, da sie direkt oder indirekt an pathologischen Prozessen - von Diabetes mellitus bis Neoplasie- beteiligt sind. Der Sialinsäure wird dabei eine besondere Rolle zugemessen, da sie an einer Reihe von Charakteristika neoplastischen Verhaltens mitwirkt: metastatische Ausbreitung, Kontaktphänome, Tumorantigenität, Transportprozesse und Virus-Rezeptoren (35).
Für das Verständnis der Sialinsäuren als Bestandteil von Glykoproteinen sind Kenntnisse über Struktur,

Stoffwechsel und Funktion dieser komplexen Moleküle notwendig. In den letzten Jahren gab es darin große Fortschritte und auch Ansätze, die Bedeutung bei pathologischen Vorgängen aufzuklären (123).

I.4 Struktur der Glykoproteine

Die Kohlenhydrat - Peptid-Bindung ist das einheitliche Strukturmerkmal der Glykoproteine. Diese Kohlenhydrateinheiten haben Molekulargewichte zwischen MG 162 (einzelner Monosaccharidrest in Kollagen) und MG 3.500 (in Fetuin). Dabei kann auf ein Molekül nur eine Kohlenhydrat-Einheit kommen (Ribonuklease B) oder 800 Kohlenhydrat-Einheiten, wie beim Glykoprotein der Gl. submandibularis des Rindes.
Da Glykoprotein-Molekulargewichte von 14.500 (Ribonuklease) bis zu 1×10^6 (Glykoprotein der Gl. submandibularis des Rindes) vorkommen, gibt die Zahl der Aminosäure pro Kohlenhydrat-Einheit ein besseres Maß für den Grad der Carbohydratation des Proteins an als die Zahl der Kohlenhydrat-Einheiten pro Molekül, z.B.:
6 Aminosäuren/Kohlenhydrat-Einheit beim Glykoprotein der Gl. submand. des Rindes und
779 Aminosäuren/Kohlenhydrat-Einheit beim IgG.
Abb.2 zeigt schematisch den Unterschied zwischen Proteinen mit hoher Kohlenhydrat-Dichte (Mucin) und geringer Kohlenhydrat-Dichte (Plasmaprotein).

Abb.2
Kohlenhydrat-Dichte an der Peptidkette zweier Typen von Glykoproteinen (nach SPIRO, 123).



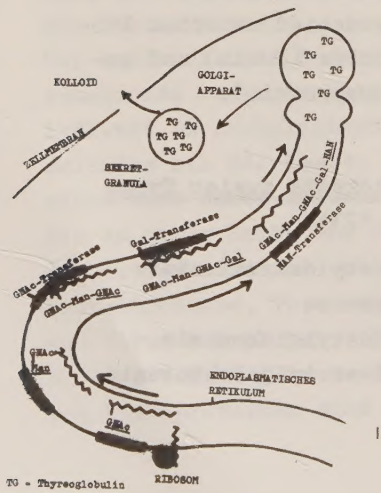
NAN: N-acetylneuraminsäure
GAL: Galaktose
GNAc: N-acetylglukosamin
GALNAc: N-acetylgalaktosamin

In beiden Beispielen der Abb.2 ist eine Peptidkette mit 120 Aminosäuren dargestellt.

I.5 Biosynthese der Glykoproteine

In-vivo Studien mit Isotopen-markierten Zuckern zeigten die intrazelluläre Lokalisation der Bindung der Kohlenhydrat-Einheiten an die Peptidkette. Für diesen Vorgang ist eine Reihe von Glykosyltransferasen notwendig, die einen aktivierten Zucker von seinem Nukleotid-Derivat auf einen makromolekularen Akzeptor übertragen. Diese Enzyme sind sowohl für das Zukker-Nukleotid als auch für den Akzeptor spezifisch. Solche Glykosyltransferasen, die in der Lage sind, Oligosaccharide mit A, B, H und Le Blutgruppenaktivität zusammenzufügen, wurden in Magenschleimhaut (54,58,157) und Milch (79,80,115) gefunden.
Die Abb.3 zeigt eine schematische Darstellung der Vorgänge, die sich vermutlich bei der Synthese eines speziellen Glykoproteins (Thyreoglobulin) abspielen.

Abb.3 Biosynthese von Thyreoglobulin - Peptidsynthese und Zuckerübertragung (nach SPIRO,123)



An den Ribosomen wird das Peptid durch den üblichen Vorgang der Proteinsynthese synthetisiert. Danach wird es wahrscheinlich durch das endoplasmatische Retikulum geschleust (95). Dort fügen membrangebundene Transferasen Zucker um Zucker an die wachsende Kohlenhydrat-Einheit. Diese Enzyme müssen nicht räumlich getrennt sein, wie in Abb.3 dargestellt, da ja ihre Spezifität die Sequenz der Ketten bestimmt. Das carbohydrierte Protein erreicht schließlich den Golgi-Apparat, wo es konzentriert, in Granula gespeichert und dann in das Lumen des Follikels abgegeben wird. In neueren Untersuchungen wurden Glykoprotein-Sialyltransferasen auch in der Erythrocytenmembran und im Serum nachgewiesen (76). Das beschriebene Schema der Glykoprotein-Biosynthese gilt wahrscheinlich für alle Zellen, die an der Synthese von Sekreten beteiligt sind, wie Schilddrüsenzellen, Pankreas-acinuszellen und Becherzellen des Intestinaltraktes (22,138). In diesen Zellen ist der Golgi-Apparat stark ausgeprägt (103). Die Enzyme, die an der Kohlenhydratübertragung beteiligt sind, sind entlang den Membranen des endoplasmatischen Retikulums (glatt und rauh) und des Golgi-Apparates lokalisiert (96).
Wie die Abb.3 zeigt, findet die Kohlenhydratverknüpfung bei der Glykoprotein-Biosynthese post-ribosomal statt und unterliegt nicht der direkten genetischen Kontrolle. Bei einer großen Zahl von Proteinen sind solche enzymatischen Stufen nach Fertigstellung ihrer Peptidketten notwendig. Diese postribosomalen Schritte sind nicht direkt codiert, sondern durch Enzymspezifität,Substrat-und Kofaktorverfügbarkeit und andere Umgebungseinflüsse festgelegt. Sie sind deshalb die Stellen für rasche physiologische Regulation der Synthese und vielleicht auch der Freisetzung von Proteinen. Hier könnten auch pathologische Vorgänge auf die Rate der Proteinsynthese einwirken, oder die Natur des geformten Produktes verändern:

So kann die Geschwindigkeit, mit der die Peptidkette das endoplasmatische Retikulum passiert, eine unvollständige Anknüpfung der Kohlenhydrat-Einheiten zu Folge haben.
Die Spezifität der Glykosyltransferasen gegenüber Zukkernukleotiden ist zwar hoch, aber nicht absolut. So wurde eine Positionsisomerie bei der Sialinsäurebindung an das α_1-saure Glykoprotein beobachtet, die einen Mangel an der vollkommenen Spezifität des Enzyms widerspiegeln könnte. Es besteht also die Möglichkeit der Substitution eines Zuckers anstelle eines anderen. Dies könnte zu Heterogenität und vielleicht sogar zu ernsthaften Strukturveränderungen bei Krankheiten führen, bei denen abnorme Mengen eines bestimmten Zucker-Nukleotids vorhanden sind (123).
Die Synthese der Glykosyltransferasen selbst ist DNS-gesteuert. Dafür ist der genetische Einfluß auf die Kohlenhydrat-Struktur der Glykoproteine mit Blutgruppenaktivität das deutlichste Beispiel (139). Das Vorhandensein oder Fehlen jeder der einzelnen Glykosyltransferasen hängt direkt von der Blutgruppe des Individuums ab (54,58,79,80,115,157).

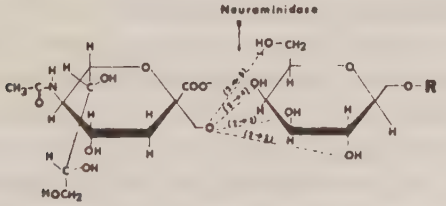
Über die Regulation der Glykoprotein-Biosynthese ist noch sehr wenig bekannt. Verschiedene Beispiele von Rückkoppelungskontrolle (feedback control) sind von KORNFELD et al.(81) beschrieben worden. So hemmt zum Beispiel in der Leber die CMP-N-acetylneuraminsäure die UDP-N-acetylglukosamin-2-epimerase, die das N-acetylmannosamin formt und dadurch die Reaktionsketten startet, die zur Synthese der Sialinsäuren-Nukleotide führt (81).

I.6 Abbau der Glykoproteine

Obwohl die Reihenfolge des Abbaus der Glykoproteine noch nicht feststeht, haben jüngere Forschungsergeb-

nisse zur Entdeckung der daran beteiligten Enzyme und der zellulären Lokalisation geführt.
Seit langer Zeit sind in den Zellen die Lysosomen bekannt (31). Diese Partikel enthalten eine große Anzahl von lytischen Enzymen, die pH-Optima im sauren Bereich haben und eine Reihe von Makromolekülen, wie Nucleinsäuren und Proteine, abbauen können. Ebenso kennt man eine Vielzahl von Glykosidasen in den Lysosomen, von denen einige identifiziert sind: β-Galaktosidase, α-N-acetyl-galaktosaminidase, β-N-acetyl-glukosaminidase, α-Mannosidase, α-Fucosidase und Neuraminidase. Diese lysosomalen Glykosidasen können gemeinsam, wahrscheinlich zusammen mit den vorhandenen Proteasen, Glykoproteine abbauen. So wurde für Fetuin gezeigt, daß die Sialinsäure → Galaktose → N-acetylglukosamin-Ketten stufenweise durch die Lysosomen der Niere und der Leber abgebaut werden können.
Abb.4 zeigt die Abspaltung der endständigen N-acetylneuraminsäure vom Glykoprotein durch Neuraminidase.

Abb.4 Angriffspunkt der Neuraminidase am Zuckerrest eines Glykoproteins (nach GOTTSCHALK, 50)



Für den Abbau einer großen Zahl von Glykoproteinen ist ein Regulationsmechanismus bekannt. Durch Entfernung der endständigen Sialinsäure wird die Leber befähigt, das desialinisierte Molekül zu erkennen und aus der Zirkulation zu entfernen. Dieses Phänomen war ursprünglich nur für Coeruloplasmin bekannt (91), gilt nun aber auch für andere natürliche Glykoproteine.

Für die Plasmaproteine stellt dies wahrscheinlich den natürlichen Abbauweg dar. Bei den gonadotropen Hormonen gibt dieser Weg eine bemerkenswerte Erklärung für die bekannte Beobachtung, daß die Entfernung der endständigen Sialinsäure stets mit einem großen Verlust der hormonellen Aktivität verbunden ist (93). Die desialinisierten Glykoproteine werden in den Hepatocyten akkumuliert und intrazellulär in den Lysosomen abgebaut (53).

I.7 Eigenschaften der Glykoproteine

Auf dem Hintergrund der Struktur und des Stoffwechsels der kohlenhydrathaltigen Proteine können die chemischen und biologischen Eigenschaften der Glykoproteine betrachtet werden.

Plasma-Glykoproteine

Die Leber ist die Hauptquelle der Plasma-Glykoproteine, mit Ausnahme der Immunoglobuline (152). Außer Albumin enthalten alle Plasma-Glykoproteine kovalent gebundene Kohlenhydrate. Sie waren als erste Glykoproteine Gegenstand von Strukturforschungen, deshalb sind von vielen die Kohlenhydrat-Anteile bekannt:
α_1-saures Glykoprotein (112), α_2-Makroglobulin (32), Transferrin (64), Coeruloplasmin (65), Fibrinogen (14), Ba-α_2-Glykoprotein (63), Haptoglobin (43) und verschiedene Immunglobuline (25,30). Tab.1, Seite 13, zeigt die wichtigsten sialinsäurehaltigen Serumproteine und deren Zuckergehalt.
Verschiedene Plasma-Glykoproteine, wie Transferrin, Coeruloplasmin, Haptoglobin, kortiko-steroid-bindendes Globulin, sind an Transportfunktionen beteiligt. Die Rolle des Kohlenhydratteils bei der Transportfunktion konnte für die Sialinsäure bestimmt werden, die spezifisch mit Neuraminidase entfernt werden kann. Nach Entfernung dieses Zuckers von Transferrin,

Tab.1 Sialinsäurehaltige Serumproteine

	Gesamt-zucker-gehalt %	Sialin-säure-gehalt %	% des Gesamt-zucker-gehalts
Gc-Komponenten	4,2	00,0	00,0
C1 q	7,81	0,31	3,8
IgM	11,8	1,3	11,0
Thyroxin-bind. Globulin	14,8	3,7	23,0
α_1-Antitrypsin	12,2	3,4	28,0
α_1-saures Glyko-protein	37,9	10,9	29,0
Coeruloplasmin	7,9	2,4	30,0
C1-Inaktivator	34,3	14,3	38,0
γ_2-Glykoprotein	10,0	5,5	55,0

Haptoglobin, Thyroxin-bindendem Globulin (11) und Kortikosteroid-bindendem Globulin (94) konnte keine Änderung der Bindungskapazität dieser Proteine beobachtet werden. So ist aber für Bindung und Transport der Serumproteine selbst an deren Membran Sialinsäure notwendig. Um die Bindung herzustellen, muß das Sialoglykoprotein zuerst desialinisiert werden (101).

Die Hauptkomponenten des Gerinnungssystems, Prothrombin und Fibrinogen, sind Glykoproteine. Dabei ist das Kohlenhydrat für die Bildung eines stabilen Gerinnsels notwendig. Die Entfernung der Sialinsäure vom Fibrinogen vor der Gerinnung führt zur Bildung eines Gerinnsels, das nur über Wasserstoffbrücken verbunden ist und leicht in Harnstofflösungen aufgelöst werden kann (23,24).

Alle 3 Hauptformen der Immunglobuline sind Glykoproteine: IgG, IgA, IgM. Ihr Kohlenhydratgehalt schwankt beträchtlich, die Zucker sind vor allem an Asparagin gebundene Heteropolysaccharide (30).

Enzyme

Viele Enzyme sind als Glykoproteine erkannt worden: Esterasen, Proteinasen, Glykosidasen, Nukleasen. Bisher gibt es keinen Hinweis auf eine direkte Beteiligung des Kohlenhydratanteils an den aktiven Stellen der Enzyme. Entfernung der Sialinsäure-Reste von Cholinesterase (33), γ-Glutamyltranspeptidase (129) Atropinesterase (86) oder Plasmaesterase (Hageman-Faktor) (113) ergab keinen signifikanten Aktivitätsverlust.

Hormone

Die gonadotropen Hormone, TSH und Thyreoglobulin, sind alle Glykoproteine. Wie schon erwähnt (s.S.12), verlieren das FSH (48) und Chorion-Gonadotropin (51) ihre Aktivität, wenn die Sialinsäure enzymatisch entferntwird. Dagegen ist der geringe Sialinsäuregehalt des ICSH für dessen Wirkung unbedeutend, obwohl die biologischen Eigenschaften von Chorion-Gonadotropin und ICSH ähnlich sind. Es ist interessant, daß der Kohlenhydratgehalt von Chorion-Gonadotropin wesentlich höher ist und dessen Aktivität von der Sialinsäure abhängt, im Gegensatz zum ICSH.

Glykoproteine muköser Sekrete

Untersuchungen dieser Glykoproteine wurden hauptsächlich an Sekreten der Gl. submandib. vom Rind durchgeführt. Sie bestehen aus Oligosaccharideinheiten von Sialinsäure, Fucose, Galaktose und N-acetylhexosamin. Eine wichtige Funktion dieser Glykoproteine besteht in der Erhöhung der Viskosität der Sekrete, einer Schutzmantel- und Gleitmittelwirkung. Im submandibulären Glykoprotein bewirken die negativen Ladungen an den zahlreichen, dicht gelagerten Disaccharid-Einheiten gegenseitige Abstoßung, dadurch Ausdehnung und Versteifung des Moleküls mit daraus resultierender Viskositätszunahme.

Wenn die Sialinsäure durch Neuraminidase entfernt oder die negative Oberflächenladung durch Titration zu einem niedrigeren pH-Wert beseitigt wird, folgt daraus eine merkliche Viskositätsabnahme des Sekretes. Die Anwesenheit von Neuraminidase in einigen Erregern, wie Pneumokokken, kann zur Entfernung der Sialinsäure-Reste im Bronchialmucin beitragen, wodurch der Schutzmantel verflüssigt und die Zelloberfläche bloßgelegt wird.

Viele der Mucine haben Blutgruppenaktivität. So hat das submandibuläre Glykoprotein beim Schwein Blutgruppen-A-Aktivität, die vom endständigen, α-gebundenen N-acetyl-galaktosamin-Rest abhängt. Außerdem sind viele Mucine starke Virus-Hämagglutination-Inhibitoren, vermutlich wegen ihres hohen Sialinsäuregehalts.

Die Biosynthese der Mucine wurde in vitro an Schaf-Colon- und menschlicher Magenschleimhaut untersucht. Dabei zeigte sich ein Inhibitoreffekt von Salicylsäure auf die Glykoproteinsynthese, die eine verminderte Aufnahme von Radioaktivität in die Aminozucker-Anteile verursacht (72). Dieser In-vitro-Effekt von Salicylat könnte für die zerstörende Wirkung von Aspirin auf die Magenschleimhaut Bedeutung haben.

Substanzen mit Blutgruppenaktivität

Die A, B, H und Lewis-Antigene sind erblich festgelegte Bestandteile der Erythrocyten-Membran. Sie kommen auch in löslichen Glykoproteinen verschiedener muköser Sekrete (s.o.) und Ovarialzysten-Flüssigkeit vor (139). Sie enthalten neben anderen Aminozuckern Sialinsäure, die bei den ABH und Lewis-Substanzen keine Antigen-determinierende Rolle spielt; ihre Entfernung führt sogar oft zu gesteigerter Aktivität (21).

Die M und N Blutgruppenantigene sind auch an der Erythrocytenmembran lokalisiert. Glykoproteine mit MM, NN und MN Blutgruppenantigenen wurden aus Erythrocyten isoliert (69). Ihr Sialinsäuregehalt stellt

ungefähr 80% des Gesamtgehalts dieses Zuckers in der Erythrocytenmembran dar. Diese antigenen Proteine vom Molekulargewicht 30.000 enthalten 58% Kohlenhydrate in Form von Galaktose, N-acetylgalaktosamin, N-acetylglukosamin, Fucose und N-acetylneuraminsäure (70). Die M und N Blutgruppenaktivität geht nach Entfernung der Sialinsäure verloren (124). Diese Antigene hemmen auch die Myxovirus-Hämagglutination, die nach Sialinsäure-Entfernung nicht mehr inhibiert wird (70).

Gehirn-Glykoproteine

Außer Glykolipiden kommen im Gehirn beträchtliche Mengen kohlenhydrathaltiger Proteine vor (127). Ungefähr 50% der Sialinsäure im Gehirn liegt als Glykoprotein vor (17,60), welches vermutlich von Membranen intrazellulärer Strukturen stammt : Synaptosomen, Mikrosomen, Axonen, Oligodendrogliaausläufer.

Glykoproteine des Bindegewebes

Bindegewebe besteht aus zahlreichen extrazellulären Proteinen, in Form von unlöslichem Fibrin, Kollagen, Elastin, sowie den Proteinen in der amorphen Matrix der Grundsubstanz. Viele dieser Proteine sind Glykoproteine mit den charakteristischen Zuckern: Galaktose, Mannose, Fucose, Glukosamin, Galaktosamin und Sialinsäure (9).

Aus der Kortikalis von Rinderknochen wurde ein interessantes Glykoprotein isoliert. Es enthält 43% Kohlenhydrate, ist sehr sauer und sein Sialinsäuregehalt beträgt 20% des Gewichtes. Dieses saure Glykoprotein könnte eine Rolle bei der Calciumbindung im Knochen spielen (7).

Kollagen- und Basalmembran-Glykoproteine

Die Kollagene sind die zahlreichsten Vertreter der Glykoproteine. Basalmembranen sind in Geweben weit verbreitet. Sie sind Bestandteil der Glomruli und Tubuli der Niere, der Kapillarwand der Gefässe, der

Lungenalveolen, Schilddrüsenfollikel (84), sowie verschiedener Anteile des Auges (Linsenkapsel, Descemet'sche und Bowman'sche Membran der Cornea, Bruch'sche Membran der Retina.). Sie fungieren dort als Mikroskelett, auf dem die Zellen ruhen, im renalen Glomerulus erfüllen sie wichtige Filtrationsaufgaben. Kollagen und Basalmembranen enthalten außer Glukose und Galaktose: Mannose, Hexosamin, Fucose und Sialinsäure. Bei der Synthese sind wiederum post-ribosomale, genetisch nicht kontrollierte Stufen (Hydroxylierung, Glykosylation, Quer-Bindungs-Formation) mögliche Stellen, wo die physiologische Regulation der Biosynthese von schädlichen Faktoren beeinflußt werden kann.

Zellmembran-Glykoproteine

Alle Zellen sind mit einer ungefähr 75 Å dicken Plasmamembran bedeckt, die die Grenze zwischen intra- und extrazellulärem Raum bildet.

Chemisch sind isolierte Plasmamembranen reich an Sialinsäure (35) und anderen Kohlenhydraten: Fucose, Mannose, Glukose, Galaktose, N-acetylglukosamin, N-acetylgalaktosamin (104,105). Diese Deckschicht gibt eine Hale-positive Reaktion als Zeichen für die Anwesenheit saurer Kohlenhydrate.

Studien an Erythrocyten haben gezeigt, daß die Zellmembran reich an Sialinsäure ist und ihre elektrophoretische Beweglichkeit in hohem Maß von der Anwesenheit dieses Zuckers abhängt (27,36).

In Erythrocyten, die keine intrazellulären Membranen oder lösliche Glykoproteine besitzen, ist die Sialinsäure an der Oberflächenmembran lokalisiert, während in anderen Zellen, wie Leberzellen (34), Ehrlich-ascites Zellen (66) und Fibroblasten, dieser Aminozucker auch mit verschiedenen intrazellulären Membranen verbunden ist (98,134,156).

Membran-Glykoproteine und Neuraminidase

Das Interesse an den Sialinsäureanteilen der Zellperipherie stammt von der Beobachtung (20), daß Filtrate von V.cholerae und Cl. perfringens die Rezeptorstellen für Influenzaviren an der Oberfläche menschlicher Erythrocyten zerstören. Außerdem reduziert dieses Rezeptor-zerstörende Enzym die negative Oberflächenladung um mehr als 50% (50). KLENK vermutete 1958, daß acylierte Neuraminsäuren an der negativen Oberflächenladung der Erythrocyten beteiligt sein könnten (77). Diese Vermutung wurde durch die Identifizierung der Neuraminidase bestätigt (5), die die glykosidische Bindung zwischen der Ketogruppe der Neuraminsäure und dem Zucker spezifisch hydrolysiert (50). Siehe dazu Abb.4, Seite11.
Von COOK et al. wurde gezeigt, daß die Sialinsäure für die negative Ladung verantwortlich ist durch deren ionisierte Carboxylgruppen (27).
Dadurch werden viele Charakteristika von Zelloberflächen bestimmt:
Wanderung von Zellen in Entzündungsherde (3),
Deformierbarkeit der Zelloberfläche:damit Mobilität,
Pseudopodienbildung und Phagocytose (149,150),
Zell-zu-Zell-Aggregation und -disaggregation (71,99),
antigene Natur der Zelloberfläche (29,111) und
Ionentransport durch Zellmembranen (46,148).
Auch bei Leukocyten und Granulocyten sind diese Zusammenhänge untersucht worden (83). Sie haben bei physiologischem pH-Wert eine negative Oberflächenladung (106), die durch Neuraminidase reduziert werden kann (110). Diese Entfernung der Sialinsäure mit Neuraminidase erhöht auch die Deformierbarkeit der Oberfläche. So wird die Fähigkeit Neuraminidase-behandelter Makrophagen gesteigert, in vitro negativ

geladene Partikel zu phagocytieren (150). Dies ist von größter Bedeutung für die Margination, das Verlassen der Gefässe, die Phagocytose und die Möglichkeit, das Knochenmark zu verlassen.
Eine interessante Arbeit von CONSTANTOPOULOS und NAJJAR (26) zeigt die Abhängigkeit der Phagocytose-Stimulation durch Tuftsin von der Sialinsäure. Behandlung von polymorphkernigen Phagocyten mit Neuraminidase hebt die Stimulation der Phagocytose-Aktivität völlig auf. Tuftsin ist der biologisch wirksame Anteil von Leukokinin, einem γ-Globulin, das an polymorphkernigen Leukocyten, Alveolarmakrophagen und peritonealen Makrophagen Phagocytose, Pinocytose und Zellmotilität stimuliert. Tuftsin als stark basisches Tetrapeptid wird dabei elektostatisch an negativ geladene Sialinsäuren der Zellmembran gebunden.
Eine weitere biologische Rolle der Zellmembran-Glykoproteine ergaben Studien mit Leukocyten. Die Entfernung der Membranzucker mit Glykosidasen behinderte die Migration vom Blut in lymphoide Gewebe (44). Man vermutet, daß die Kohlenhydrat-Einheiten eine Rolle bei der Erkennung der Lymphzellen durch die komplementären Zellen an den Kapillaren spielen, die die Passage der Lymphocyten vom Blut in Lymphgewebe kontrollieren.
Aus der Erythrocytenmembran wurden Sialinsäure-haltige Glykoproteine isoliert, die die M und N Antigene, sowie den Myxovirus-Rezeptor enthalten, wie auf Seite 15 und 16 erwähnt (12,107,153). Die Inhibition der durch Influenzaviren bedingten Hämagglutination mit Sialinsäure-haltigen Glykoproteinen deutet auf eine Rezeptorfunktion für die Sialinsäuren hin.

Dabei bestimmt die Anzahl der Sialinsäure-Reste, die gleichzeitig mit komplementären Strukturen der Virusoberfläche in Kontakt treten können, die Aktivität dieser Inhibition.
Die Entfernung der Plasmamembran-Sialinsäure mit Neuraminidase hat eine erhöhte Immunogenität der Oberflächenantigene dieser Zellen zu Folge (108).
Aus einer Arbeit von CORMACK (28) gehen Zusammenhänge zwischen Antigenität und Adhäsivität hervor.
Schließlich spielen die Sialinsäuren der Zelloberflächen eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation, wie sie von VAHERI et al. (130) beschrieben wird:
Die Proliferation normaler Zellen stoppt, wenn in-vitro-Kulturen konfluierende Monoschichten geformt haben. Dieser Vorgang wird als Dichte-abhängige Wachstumshemmung (DDI: density-dependant inhibition of growth) bezeichnet. Die Zellen können durch proteolytische Enzyme und oberflächenaktive Substanzen von der DDI befreit werden . Geringe Neuraminidase-Konzentrationen initiieren bei ruhenden, stationären Zellkulturen Proliferation. Das beweist den direkten Einfluß der Sialinsäuren der Zelloberflächen auf die Wachstumskontrolle.

I.8 Biologie der Glykoproteine - Zusammenfassung

Bei der Vielzahl der diskutierten Glykoproteine wurde gezeigt, daß diese Gruppe konjugierter Proteine höchst unterschiedliche Funktionen ausübt. Sie sind an so verschiedenen Reaktionen, wie Gerinnung, Antigen-Antikörper-Reaktionen, Ionen- und Hormontransport und Bindungsphänomenen (Vitamin B_{12}, Biotin) beteiligt. Sie können Hormon- und Enzymwirkung haben und als Gleitmittel, Filtrationsbarriere und Stützelement dienen. Als Bestandteil von Zelloberflächen nehmen sie an Immunreaktionen teil,

dienen als Virusrezeptor und wirken bei der Determinierung zellulärer Interaktionen mit.
Bei diesen vielfältigen biologischen Eigenschaften der Glykoproteine spielt der Kohlenhydratanteil und dessen Sialinsäuregehalt eine entscheidende Rolle. Die Sialinsäuren sind Rezeptoren im Erkennungsprozeß von Oberflächenstrukturen. Daraus erklären sich eine Reihe von Beobachtungen:

- Hormone, wie das Choriongonadotropin und das Follikel-stimulierende Hormon erkennen ihre Wirkorte(Zielzellen) mit Hilfe der Sialinsäuren, ohne die sie inaktiv sind.
- Sialinsäure-freie Glykoproteine (Asialoglykoproteine) werden von Plasmamembranen der Hepatocyten mit spezifischen Sialyltransferasen erkannt (negativer, "maskierender" Effekt der Sialinsäuren).
- Hämagglutination der Erythrocyten durch Myxoviren.

Sialinsäuren bestimmen auch andere Oberflächeneigenschaften:

- Viskosität und lubrifizierende Eigenschaften der Mucine,
- Stabilität des Fibringerinnsels,
- Organisation von Zellmembranen und Grundsubstanz.

In der Biosynthese der Glykoproteine besteht eine wichtige Gemeinsamkeit darin, daß die Bindung der Kohlenhydrate an die Peptidkette durch Glykosyltransferasen nach der Proteinsynthese in einer postribosomalen Stufe geschieht. Dort kann eine Regulationskontrolle durch Umgebungseinflüsse stattfinden. So könnte eine Zunahme der verfügbaren Zuckernucleotide zu einer beschleunigten Glykoproteinsynthese führen.

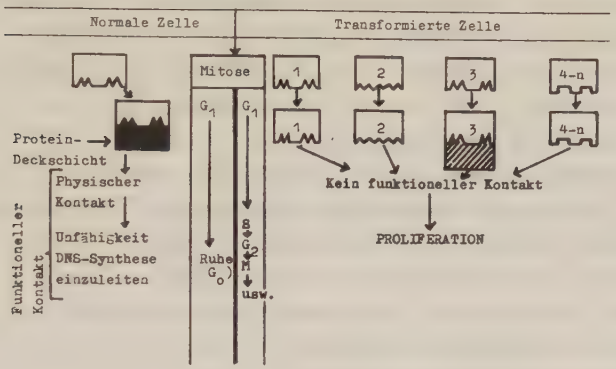
I.9 Rolle der Sialinsäure bei Tumorentstehung und Tumorwachstum

Maligne Zellen proliferieren mehr oder weniger ungehindert und sind zur Migration befähigt, die zu invasivem und metastatischem Wachstum führt. Studien an Tumorzellen sollten darüber Aufschluß geben, ob Strukturveränderungen ihrer Plasmamembran für das abnorme Wachstum, den Verlust von Kontakt-Inhibition und Änderungen der Oberflächenantigene verantwortlich sind (133).
Sialinsäuren sind bei diesen Zellkontakt- und Erkennungsprozessen beteiligt (131) und können deshalb zum Verlust der Kontaktinhibition des Wachstums beitragen.
Es wurde eine spezifische, wachstumsabhängige Sialyltransferase gefunden (137), deren erhöhte Aktivität zur gesteigerten Sialinsäure-Dichte an transformierten (und mitotischen normalen) Zelloberflächen führt (45). Dies ist ein Beispiel für die Ähnlichkeit der Eigenschaften von transformierten und mitotischen Zellen:

- Loslösung von umgebenden Zellen,
- Verlust der Kontaktinhibition, d. h., stabilen lateralen Zellkontakt herzustellen (2).

Möglicherweise ist die Tumorzelle im Stadium der Mitose"eingefroren", in dem funktionelle Kontaktreaktionen unmöglich sind. Damit fehlt das Signal, welches die Einleitung der DNS-Synthese verhindert (19,35). Die Abb.5 soll diese Unterschiede zwischen normalen und transformierten Zellen schematisch darstellen.(s.S. 23).
Oberflächen-Glykoproteine sind auch bei der Anheftung von Tumorzellen an Gefäßendothelien bei Tumormetastasierung beteiligt (28). Eine Untersuchung der Metastasierung von TA-3-Tumorzellen wies auf

Abb.5 Schematische Darstellung der Oberflächenveränderungen



die Bedeutung einer Hale-positiven Deckschicht an Tumorzellen und Epithelien von Mäuse-Lungenkapillaren hin, die durch Neuraminidase entfernt werden kann (41). Die Anzahl der Metastasen, die sich aus den TA-3-Asciteszellen,i.v. injiziert, entwickelten, konnte durch vorherige i.v.-Injektion von Neuraminidase gesenkt werden. Die Sialinsäure-abhängige negative Oberflächenladung und die elektrophoretische Mobilität der Zellen spielt dabei eine wichtige Rolle (135).

Neuraminidase hat auch einen Einfluß auf die Invasivität von Polyoma-transformierten Fibroblasten in Organkulturen. Es wird vermutet, daß Oberflächen-Sialinsäuren Adhäsiveigenschaften auf Tumorzellen übertragen können. Daher kann man den Sialinsäuren der Zelloberflächen zwei Funktionen zuschreiben:

1. Sialinsäuren wirken bei der Antigenität der Zellen mit.
2. Sialinsäuren sind an der Anheftung dissoziierter Tumorzellen an Membranen beteiligt.

Die Sialinsäure der Tumorzellperipherie kann tumorassoziierte Transplantationsantigene maskieren oder abschirmen und immunkompetente Lymphocyten "abstoßen". Durch vorherige Entfernung der Sialinsäure mit Neuraminidase erscheint die Antigenität von Tumorzellen stark gesteigert. Das ist ein Ansatzpunkt für die Immuntherapie maligner Tumoren.

Neuraminidase-Behandlung von Zellen bewirkt auch:

- Verringerung der negativen Ladungen der Zellmembran,
- Erhöhung der Deformierbarkeit der Zellen,
- verstärkte Phagocytose durch Makrophagen.

In diesem Zusammenhang sind zwei bemerkenswerte Experimente durchgeführt worden.

1. Transplantationsexperimente (109,111).
   Tumorzellen mit und ohne vorherige Inkubation mit Neuraminidase wurden auf Tiere überimpft, und die Häufigkeit der resultierenden Tumoren registriert.
2. Tumorregressions-Experimente(118.119,120).
   Hier versuchte man, Regression eines etablierten Tumors zu erreichen durch Verabfolgung Neuraminidase-behandelter maligner Zellen desselben Typs.

Diese Tumorregressions-Experimente von SIMMONS et al. seien kurz berichtet.

Bei einer Serie von Versuchen wurden auf syngene Mäuse zwei Fibrosarkome, MC-42 und MC-43, übertragen, die ursprünglich bei C3H/HeJ-Mäusen mit 3-Methylcholanthren induziert worden waren. Die Tumoren sind spezifisch immunogen, da das MC-42-Fibrosarkom Tiere nicht gegen das MC-43-Fibrosarkom immunisiert (oder umgekehrt) und beide Sarkome keine Spontanregression zeigen(57).

Tiere mit etablierten Tumoren wurden mit Tumorzellen geimpft, die mit aktiver, bzw. mit Hitze-inaktivierter Neuraminidase behandelt worden waren.

Totalregression einiger Fibrosarkome folgte auf Inokulation von Tumorzellen, die mit aktiver Neuraminidase behandelt worden waren.

Regression wurde nicht induziert durch Inokulation von Zellen, die mit Hitze-inaktivierter Neuraminidase behandelt worden waren. Dieselbe Beobachtung wurde bei Zellen gemacht, die mit Neuraminidase und einem Überschuß an freier Sialinsäure inkubiert worden waren.
Die Versuche zeigen, daß die beobachtete Tumorregression als das Resultat erhöhter Immunogenität anzusehen ist, die die Injektion Neuraminidase-behandelter Tumorzellen hervorgerufen hat.
Der gleiche Effekt ist auch durch Röntgenbestrahlung der Zellen mit letalen Dosen zu erreichen.
Die Zellen erfahren eine erhöhte Deformierbarkeit, wenn degenerative Veränderungen stattfinden, und lysosomale und andere Enzyme Autolyse bewirken.
Die aus den Lysosomen freigesetzte Neuraminidase verstärkt die Immunantwort gegenüber Tumorzellen.
Umgekehrt spielen Sialinsäuren bei der Maskierung antigener Stellen maligner Zellen eine große Rolle.
So fehlt zum Beispiel eine Abstoßungsreaktion gegenüber fötalem Gewebe, dessen Oberfläche eine Sialinsäure-reiche Glykoproteinschicht besitzt.

Die Sialinsäuren sind ein biologisches Kennzeichen neoplastischer Veränderung, welches mit verschiedenen chemischen und immunologischen Methoden getestet werden kann.
Solche Untersuchungen können für die Diagnose verschiedener Typen neoplastischer Erkrankungen von Nutzen sein, wie sie KROLIKOWSKI et al. beim Bronchialcarcinom durchgeführt haben (82).
Im Thiobarbitursäure-Test nach WARREN (136) steht seit langer Zeit eine empfindliche Methode für die Bestimmung der Sialinsäure zur Verfügung. Dadurch

war es möglich, bei einer großen Zahl von Patienten die Konzentration der Sialinsäure im Serum zu bestimmen. Die Serienuntersuchungen der vorliegenden Arbeit sollten feststellen, ob Konzentrationsunterschiede im Serum von Patienten mit

- Bronchialcarcinom,
- anderen malignen Krankheiten und
- nicht-malignen Lungenerkrankungen

gegenüber gesunden Kontrollpersonen sowie untereinander bestehen.
Gleichzeitig sollte die Möglichkeit geprüft werden, die Sialinsäurebestimmung zur Diagnose und Differentialdiagnose des Bronchialcarcinoms heranzuziehen.

II. MATERIAL UND METHODEN

II.1 Patienten

Die Konzentration der Sialinsäure im Serum von 588 Patienten wurde untersucht.
Bei den Patienten mit Bronchialcarcinom sind während des Untersuchungszeitraums von Mai 1977 bis August 1978 jeweils mehrere Seren bestimmt worden. Aus diesen Einzelwerten wurde auch der Mittelwert ermittelt.
98 Patienten waren Blutspender und repräsentieren die Kontrollgruppe.
162 Patienten hatten ein histologisch gesichertes Bronchialcarcinom. Diese Gruppe wurde entsprechend der histologischen Klassifizierung dieses Carcinoms unterteilt:

70 Patienten mit Plattenepithelbronchialcarcinom,
von denen 17 operiert und
53 nicht operiert worden waren.
44 Patienten mit kleinzelligem Bronchialcarcinom,
23 Patienten mit großzelligem Bronchialcarcinom,
8 Patienten mit Adeno-Bronchialcarcinom,
17 Patienten mit Bronchialcarcinom mit unsicherer Klassifizierung.

162 Patientinnen waren an Mamma-Carcinom erkrankt,
34 von ihnen hatten nachgewiesene Lungenmetastasen,
28 Patientinnen mit Diagnose Collum-Carcinom,
19 Patientinnen mit Diagnose Corpus-Carcinom,
14 Patienten mit HODGKIN-Lymphom,
17 Patienten mit Non-HODGKIN-Lymphom.

88 Patienten hatten nicht-maligne Lungenerkrankungen,
59 davon Tuberkulose und
29 chronisch obstruktive Lungenerkrankungen.

Die Seren dieser Patienten erhielten wir aus der

Universitätsklinik für Strahlentherapie und Röntgendiagnostik der Universität Marburg, der Betriebseinheit für Bluttransfusionsdienst der Universität Marburg, dem
Sanatorium Sonnenblick, Tuberkulosekrankenhaus der Landesversicherungsanstalt Hessen, sowie der Klinik Waldhof Elgershausen, Klinik für Lungen- und Bronchialerkrankungen.
Die Seren wurden bis zur Untersuchung tiefgefroren aufbewahrt und vor dem Test bei Zimmertemperatur aufgetaut.

II.2 Sialinsäure-Test

Schwefelsäure, Ortho-Phosphorsäure, Natrium-meta-Perjodat, Natrium-meta-Arsenit, Natriumsulfat und Cyclohexanon wurden bei MERCK AG, Darmstadt, 2-Thiobarbitursäure bei SERVA, Heidelberg, gekauft.
Die Bestimmung der Sialinsäurekonzentration wurde nach der Methode von WARREN durchgeführt (136).

Lösungen:

- zur Serumhydrolyse: 0,1143 N Schwefelsäure (320 µl 96%ige Schwefelsäure (Dichte1,4) wurden mit Aqua bidest. ad 100ml versetzt).

- Lösung nach WARREN 1: 44,1g Ortho-Phosphorsäure werden in 8 ml Aqua bidest. und 2,15 g Natrium-meta-Perjodat in 4ml Aqua bidest. getrennt unter Erwärmung gelöst, dann zusammengegeben und mit Aqua bidest. auf 50ml aufgefüllt.
(0,2M Perjodatlösung in 9M Phosphorsäure)

- Lösung nach WARREN 2: 10g Natrium-meta-Arsenit und 7,1g Natriumsulfat werden mit 280µl 96%iger Schwefelsäure versetzt und mit Aqua bidest. auf 100ml aufgefüllt. (10%iges Na-Arsenit in einer

Lösung von 0,5M Na-sulfat - 0,1N Schwefelsäure)

> Lösung nach WARREN3: 14,2g Natriumsulfat und 1,2g Thiobarbitursäure werden ad 100ml mit Aqua bidest. unter langsamem Erwärmen gelöst. (0,6%ige Thiobarbitursäure in 0,5M Na-sulfat)

Die Lösungen wurden bei Zimmertemperatur gelagert und sind über mehr als 4 Wochen stabil.

Test-Verfahren

Im Schliff-Reagenzglas wird 1ml Serum mit 7ml 0,1143N Schwefelsäure gemischt, das Glas verschlossen und 1 Stunde bei 80°C inkubiert (im Wasserbad). Anschließend wird mit 0,7ml 1 N Natronlauge neutralisiert (auf pH 6,5 - 7). Die Ausfällung wird 2x2 min. in einer Eppendorf-Laborzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wird im WARREN-Test gemessen.
200µl Überstand werden mit 100µl WARREN-1-Lösung bei Zimmertemperatur gemischt und 20 Minuten stehen gelassen.
Danach wird mit 1ml WARREN-2-Lösung versetzt und das Reagenzglas so lange geschüttelt, bis ein gelbbrauner Niederschlag verschwindet.
3ml WARREN-3-Lösung werden hinzugefügt, die Gläser geschüttelt, gut verschlossen und 15 Minuten lang in heftig kochendem Wasserbad erhitzt.
Danach werden die Reagenzgläser im Eisbad 5 Minuten gekühlt, wobei die rote Färbung oft verblasst und die Lösung flockig wird. Dies beeinträchtigt die endgültige Messung nicht.

Die gesamten 4,3ml der wässerigen Lösung werden mit 4,3ml Cyclohexanon extrahiert. Dazu wird die Suspension zweimal kräftig geschüttelt und dann 5 min.

bei 3.000g in einer Laborzentrifuge zentrifugiert. Das Chromogen befindet sich nun in der klaren Cyclohexanon-Phase.
In Glasküvetten (Schichtdicke 1cm) wird die Extinktion im Spektralphotometer gegen einen Leerwert gemessen, bei dem der Test anstelle von Serum mit Aqua bidest. durchgeführt wurde.

Sialinsäuren haben ein Absorptionsmaximum bei der Wellenlänge 549nm. Gleichzeitig gibt es ein zweites Maximum bei 532nm wegen der Anwesenheit von 2- Desoxyribose. Die Extinktion muß deshalb bei beiden Wellenlängen gemessen, und eine Korrektur angebracht werden, da die Interferenz beträchtlich ist.

Die N-acetylneuraminsäure und 2-Desoxyribose haben folgende molekulare Extinktionskoeffizienten:

N-acetylneuraminsäure bei 549nm: $\varepsilon_1 = 57 \cdot 10^{-3}$
532nm: $\varepsilon_2 = 26 \cdot 10^{-3}$

2-Desoxyribose bei 549nm: $\varepsilon_3 = 48 \cdot 10^{-3}$
532nm: $\varepsilon_4 = 133 \cdot 10^{-3}$

Die Gleichung für die Konzentration der Sialinsäure lautet unter Berücksichtigung der Interferenz mit 2-Desoxyribose:

µmol N-acetylneuraminsäure =

(1)
$$= \left[\frac{\varepsilon_4}{\varepsilon_1 \cdot \varepsilon_4 - \varepsilon_2 \cdot \varepsilon_3} \cdot OD_{549} - \frac{\varepsilon_3}{\varepsilon_1 \cdot \varepsilon_4 - \varepsilon_2 \cdot \varepsilon_3} \cdot OD_{532} \right]$$

wobei OD_{549} die Gesamtextinktion bei 549nm
und OD_{532} die Gesamtextinktion bei 532nm ist.

Setzt man die entsprechenden Werte der molekularen Extinktionskoeffizienten in Gleichung (1) ein, so ergibt sich für die Neuraminsäurekonzentration:

µmol N-acetylneuraminsäure=

$$(2) \qquad = 0{,}021 \cdot OD_{549} - 0{,}00758 \cdot OD_{532}$$

Die Gleichung (2) muß noch mit dem Volumen der Testmenge multipliziert werden:

µmol N-acetylneuraminsäure=

$$= \left[0{,}021 \cdot OD_{549} - 0{,}00758 \cdot OD_{532} \right] \cdot 4{,}3$$

$$(3) \qquad = 0{,}09 \cdot OD_{549} - 0{,}033 \cdot OD_{532}$$

Zusätzlich muß die Menge Sialinsäure, die in 200µl Serum enthalten ist, unter Berücksichtigung der Verdünnung (1:8) und der Neutralisationsmenge (0,7ml) auf 1ml Serum umgerechnet werden.
Dies ergibt folgenden Faktor F :

$$F = 5 \cdot \frac{8{,}7}{8} \cdot \frac{8}{1} = 43{,}5$$

Damit heißt die endgültige Formel zu Berechnung der Konzentration der Sialinsäure in einem Milliliter Serum:

$$(4) \quad \text{µmol N-acetylneuraminsäure} \cdot \text{ml Serum}^{-1} =$$

$$= \left[0{,}09 \cdot OD_{549} - 0.033 \cdot OD_{532} \right] \cdot 43{,}5$$

II.3 Statistik

Aus den Meßwerten einer Gruppe wurde der Mittelwert $\bar{x}$ und die Standardabweichung s bestimmt.
Die Signifikanzprüfung zwischen zwei Gruppen wurde mit dem STUDENT-t-Test (2-seitig) auf dem 95% - Signifikanz-Niveau durchgeführt.
Die errechneten $\hat{t}$-Werte und Freiheitsgrade wurden mit der Tabelle der Signifikanzschranken der STUDENT - Verteilung (37) verglichen.

III. ERGEBNISSE

III.1 Kontrollen

Tabelle 2 zeigt die Konzentration der serumgebundenen Sialinsäure bei 98 Kontrollpersonen.
Es handelt sich um gesunde Blutspender beiderlei Geschlechts ohne Tumoren oder bekannte Lungenerkrankungen. 60 von ihnen wurden getrennt nach Geschlecht untersucht.

Tab.2 Sialinsäurekonzentration bei Kontrollpersonen

Gruppe	Anzahl der Personen	Sialinsäure µmol/ml
weiblich	30	2,433 ± 0,271
männlich	30	2,277 ± 0,380
weiblich undmännlich	38	2,3027 ± 0,291
Total	98	2,3357 ± 0,3218

In der Literatur werden verschiedene Werte für die Konzentration der Sialinsäure im Serum angegeben. Bei Bestimmungen nach dem Thiobarbitursäure-Test:

1,69µmol/ml ± 0,19 (WATKINS)
1,78µmol/ml ± 0,23 (SAIFER)
1,69µmol/ml ± 0,18 (McNEIL), ein Wert von
2,17µmol/ml ± 0,19 (GERBAUT) wird im AMINOFF-Thiobarbitursäure-Test gemessen, allerdings ohne Korrektur für die Störinterferenz durch 2-Desoxyribose (42).

Wesentlich geringere Sialinsäurekonzentrationen werden von KROLIKOWSKI et al. (82) angegeben:

0,432 µmol/ml ± 0,067.
Sie unterscheiden ebenfalls zwischen weiblichen und männlichen Kontrollpersonen, wobei sich auch kein signifikanter Unterschied ergibt (0,432, bzw. 0,443).

III.2 Patienten mit Bronchialcarcinom (BC)

Bei 162 Patienten mit histologisch gesichertem Bronchialcarcinom wurden die Serumwerte der Sialinsäure bestimmt. Es wurden bei jedem dieser Patienten mehrere Proben untersucht, die insgesamt 420 Einzelwerte ergaben.
Innerhalb dieser Patientengruppe wurde eine histologische Klassifizierung vorgenommen.
Patienten mit :

- Plattenepithel-Bronchialcarcinom,
- kleinzelligem Bronchialcarcinom,
- großzelligem Bronchialcarcinom und
- Adeno-Bronchialcarcinom.

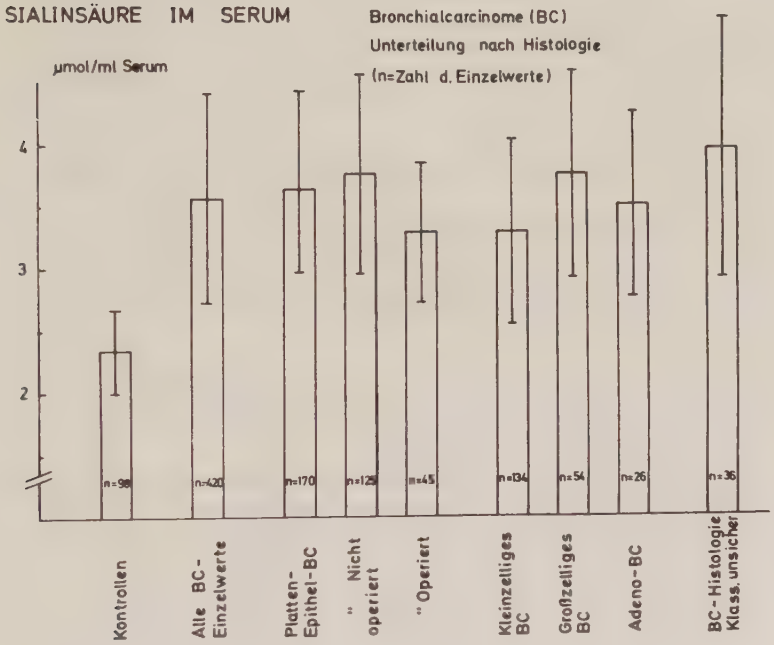
Bei 17 Patienten war die histologische Klassifizierung nicht möglich.
In Tab.3 und Abb.6 sind die Mittelwerte sämtlicher Einzelwerte mit Standardabweichungen dargestellt.

Tab.3 Sialinsäurekonzentration im Serum von Patienten mit Bronchialcarcinom

Gruppe	Anzahl der Seren	Sialinsäure µ mol/ml
Plattenepithel-BC	170	3,6447 ± 0,7973
Kleinzelliges BC	134	3,2989 ± 0,7576
Großzelliges BC	54	3,7745 ± 0,860
Adeno-BC	26	3,5250 ± 0,758
BC ohne sichere Klassifizierung	36	3,9650 ± 1,058
Total	420	3,5711 ± 0,8404

Alle Werte sind gegenüber den gesunden Kontrollen signifikant erhöht ($p < 0{,}0001$).

Abb.6 Sialinsäure im Serum
Bronchialcarcinome (BC) - Unterteilung nach Histologie (n = Anzahl der Einzelwerte)



Von WATKINS (140), wie auch von anderen, wird eine Abhängigkeit der Sialinsäurekonzentration von der Tumorausdehnung vermutet. Wir untersuchten deshalb die Sialinsäure-Werte bei operierten und nicht-operierten Patienten mit Plattenepithelcarcinom.
Die Ergebnisse sind in Tab.4 und Abb.6 (Seite 35) dargestellt.

Tab.4 Sialinsäurekonzentration bei operierten und nicht-operierten Patienten mit Plattenepithel-Bronchialcarcinom.

Gruppe	Anzahl der Seren	Sialinsäure µmol/ml
operiert	45	3,294 ± 0,622
nicht-operiert	125	3,771 ± 0,818

Die nicht operierten Patienten mit Plattenepithel-BC haben signifikant höhere Werte als die operierten Patienten mit ihrer geringeren Tumormasse ($p < 0{,}001$).

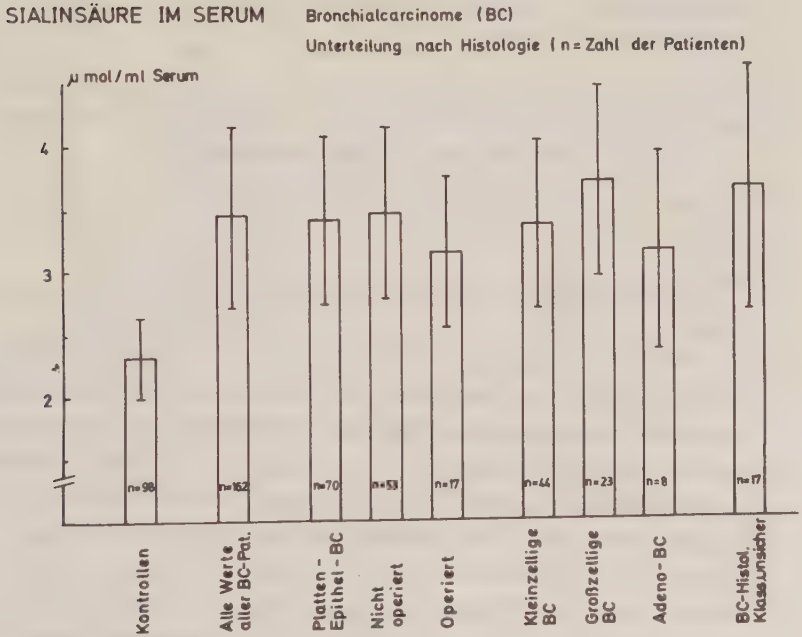
Es gibt auch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Tumortypen, wie aus den Sialinsäurewerten (Tab.3 und Abb.6) hervorgeht.
So sind sowohl das Plattenepithel-BC, als auch das großzellige Bronchialcarcinom in ihren Sialinsäurewerten gegenüber dem kleinzelligen Bronchialcarcinom signifikant erhöht ($p < 0{,}001$). Dagegen zeigen die Werte der Patienten mit Adeno-Bronchialcarcinom keine signifikanten Unterschiede zu den anderen Klassen.

Um die Unterschiede zwischen den Patienten mit obengenannten Diagnosen zu prüfen, wurde für jeden Patienten aus der Vielzahl seiner Einzelwerte der Mittelwert errechnet. Diese Mittelwerte sind in Tab.5 und Abb.7 zusammenfassend dargestellt.

Tab.5 Mittlere Sialinsäurekonzentration im Serum von 162 Patienten mit Bronchialcarcinom

Gruppe	Anzahl der Patienten	Sialinsäure µmol/ml
Plattenepithel-BC	70	3,396 ± 0,6840
Kleinzelliges BC	44	3,361 ± 0,6730
Großzelliges BC	23	3,712 ± 0,7744
Adeno-BC	8	3,178 ± 0,8060
BC ohne sichere Klassifizierung	17	3,668 ± 0,9980
Total	162	3,4493 ± 0,7431

Abb.7 Sialinsäure im Serum
Bronchialcarcinome (BC) - Unterteilung nach Histologie (n = Anzahl der Patienten)



In dieser "gemittelten" Darstellung (Tab.5 und Abb.7) sind die Unterschiede zwischen operierten und nicht operierten Plattenepithel-Bronchialcarcinomen nicht mehr signifikant. Dasselbe gilt für die Differenzen zwischen Plattenepithel- und großzelligem Bronchialcarcinom gegenüber dem kleinzelligen Bronchialcarcinom.

III.3 Nicht-maligne Lungenerkrankungen

Bei dieser Patientengruppe ist jeweils nur eine Probe entnommen worden, weshalb die getrennte Darstellung der Einzelwerte und der Mittelwerte je Patient entfällt.
In Tab.6 und Abb.8 sind die Ergebnisse von Sialinsäurebestimmungen bei 88 Patienten mit nicht-malignen Erkrankungen der Lunge aufgeführt.
59 dieser Patienten waren an Lungentuberkulose (Tb) erkrankt und 29 hatten chronisch obstruktive Lungenerkrankungen (COLE).

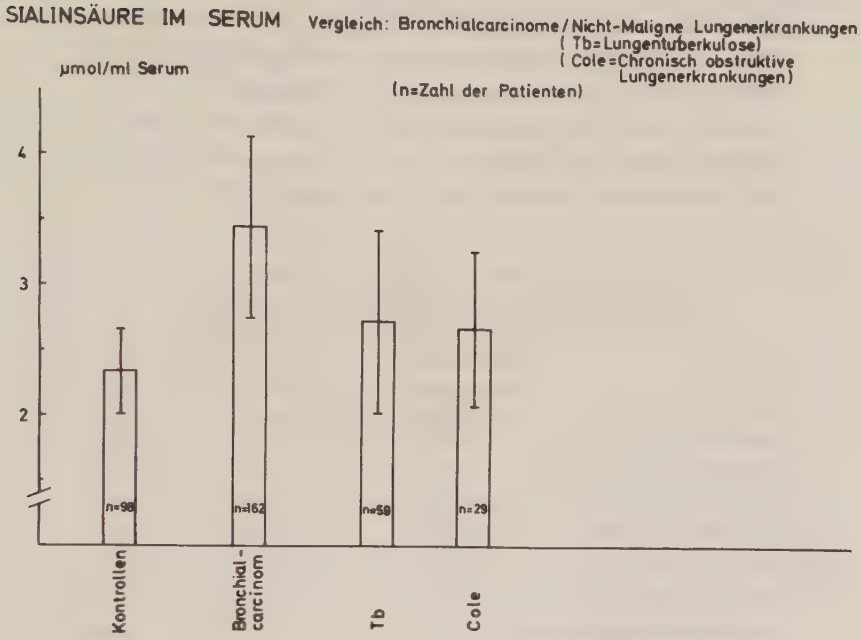
Tab.6 Sialinsäurekonzentration im Serum von Patienten mit nicht-malignen Lungenerkrankungen

Gruppe	Anzahl der Patienten	Sialinsäure µmol/ml
Tb	59	2,737 ± 0,714
COLE	29	2,691 ± 0,595
Total	88	2,733 ± 0,648

Signifikante Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen bestehen nicht.Dagegen ist der Mittelwert (2,733 µmol/ml) gegenüber dem Mittelwert der Kontrollen (2,3357 µmol/ml) in statistisch signifikanter Weise erhöht ($p < 0,0001$). Die Patienten mit Bronchialcarcinom haben nicht nur höhere Sialinsäurewerte (3,4493 µmol/ml) als gesunde Kontrollen (2,3357 µmol/ml),sondern auch höhere Werte als Patienten mit nicht-malignen Lungenerkrankungen (2,733 µmol/ml), $p < 0,0001$.

Abb.8 Sialinsäure im Serum

Vergleich: Bronchialcarcinome/nicht-maligne Lungenerkrankungen (n = Anzahl der Patienten)



III.4 Patienten mit anderen malignen Erkrankungen

Den Ergebnissen bei Patienten mit Bronchialcarcinom sollten die Sialinsäurewerte des Serums von Patienten mit anderen malignen Erkrankungen gegenübergestellt werden.

Die Sialinsäure-konzentration wurde bei 240 Patienten mit folgenden Diagnosen bestimmt:

- Mamma-Carcinom
- Collum-Carcinom
- Corpus-Carcinom
- Hodgkin-Lymphom
- Non-Hodgkin-Lymphom.

Auch hier wurde innerhalb einer Gruppe, den Patientinnen mit Mamma-Carcinom, eine Unterscheidung hinsichtlich der Tumorausdehnung vorgenommen. Die Patientinnen mit nachgewiesenen Lungenmetastasen sind in einer gesonderten Gruppe zusammengefaßt. Die Ergebnisse zeigen Tab.7 und Abb.9 (Seite 41).

Tab.7 Sialinsäurekonzentration im Serum von Patienten mit malignen Erkrankungen

Gruppe	Anzahl der Patienten	Sialinsäure µmol/ml
Mamma-Carcinom	128	2,7763 ± 0,4412
Mamma-Carcinom mit Lungenmetastasen	34	3,4408 ± 0,7032
Collum-Carcinom	28	2,9541 ± 0,4358
Corpus-Carcinom	19	2,9356 ± 0,3311
HODGKIN-Lymphom	14	2,9408 ± 0,4262
Non-HODGKIN-Lymphom	17	2,7974 ± 0,3080

Aus diesen Ergebnissen ergibt sich folgendes:

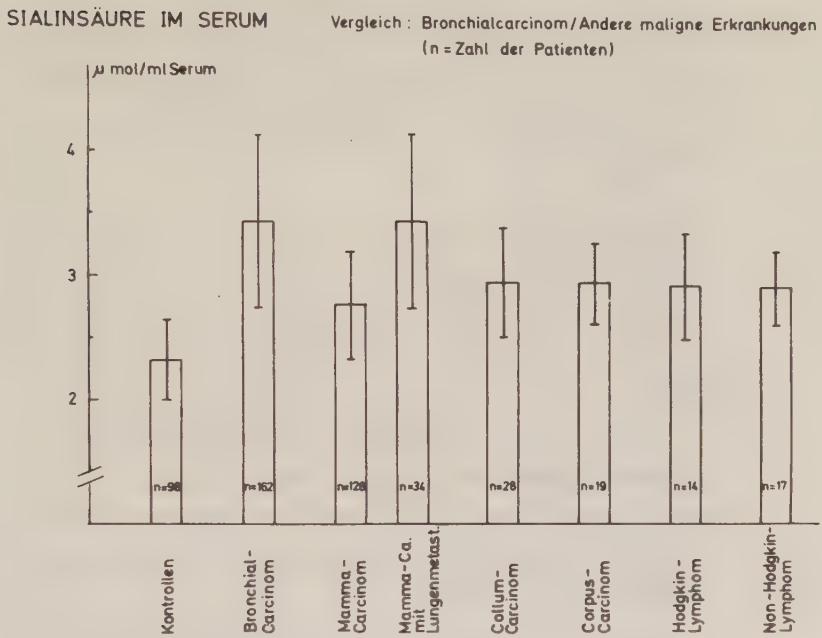
Wie erwartet und von anderen Autoren beschrieben, findet man einen hochsignifikanten Anstieg der Sialinsäure im Serum bei allen malignen Erkrankungen der Tab.7 gegenüber gesunden Kontrollen (Tab.2): $p<0,0001$.

Ebenso signifikant ist die Erhöhung der Sialinsäure im Serum von Patienten mit Bronchialcarcinom (3,4493 ± 0,7431) gegenüber den anderen malignen Erkrankungen der Tab.7 , mit einer Ausnahme:

die Werte der Patientinnen mit Mamma-Carcinom und Lungenmetastasen (3,4408 ± 0,7032) sind beinahe gleich hoch wie die Werte der Patienten mit Bronchialcarcinom (3,4493 ± 0,7431).

Abb.9 Sialinsäure im Serum

Vergleich: Bronchialcarcinom/andere maligne Erkrankungen (n = Anzahl der Patienten)



In Abb.9 sind die Mittelwerte der Kontrollen, der Patienten mit Bronchialcarcinom und der Patienten mit anderen malignen Erkrankungen zusammenfassend graphisch dargestellt.

Aus den gewonnenen Ergebnissen ist deutlich zu erkennen, daß die Konzentration der Serum-Sialinsäure gegenüber gesunden Kontrollen erhöht ist bei:

- malignen Erkrankungen und
- nicht-malignen Lungenkrankheiten.

Weiter ergibt sich, daß die Konzentration der Sialinsäure im Serum von Patienten mit Bronchialcarcinom signifikant höher ist als bei Patienten mit:

- Mamma-Carcinom
- Collum-Carcinom
- Corpus-Carcinom
- HODGKIN-Lymphom
- Non-HODGKIN-Lymphom
- nicht-malignen Lungenerkrankungen (Abb.9).

Keine, oder nur bedingte signifikante Unterschiede ergaben sich bei:

- Lungentuberkulose und chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen,
- verschiedenen Bronchialcarcinom-Typen zum Teil,
- Bronchialcarcinom und Mamma-Carcinom mit Lungenmetastasen,
- weiblichen und männlichen Kontrollpersonen.

IV. DISKUSSION

Zelloberflächen und Zellmembranen spielen eine wichtige Rolle bei neoplastischem Verhalten. Hauptkomponenten dieser biologisch aktiven Strukturen sind Glykoproteine und Glykolipide (35,123). Die Sialinsäure ist einer ihrer Kohlenhydratbestandteile und für eine Reihe von Charakteristika der Malignität verantwortlich: metastatische Ausbreitung, Kontaktphänomene, Tumorantigenität, Transportvorgänge, virale Rezeptoren (82).

So wird in vielen Untersuchungen eine Erhöhung der Serum-Sialinsäure bei malignen Erkrankungen festgestellt (13,42,59,67,78,85,106,117,140,142,151). Von anderen Autoren wird auch eine erhöhte Sialinsäurekonzentration in Zellen, bzw. im Gewebe nachgewiesen (18,56,59,73,75,83,88,89,97,100,108,123,131,137,141,146).

Mit einer Ausnahme liegt die Sialinsäure nur an Proteine und Lipide gebunden vor (140): 1967 berichten MONTREUIL et al. von der Stoffwechselstörung bei einem Kind, die mit geistiger Retardation, skelettalen Abnormitäten und Ausscheidung der freien N-acetylneuraminsäure einhergeht (90).

Im Zusammenhang mit diesen Erkenntnissen sind große Anstrenungen zur Entwicklung von Techniken für den Nachweis neoplastischer Erkrankungen unternommen worden. Es wurden "biologische Marker" oder Substanzen gesucht, die mit Neoplasie in Verbindung stehen und durch verschiedene immunologische oder chemische Methoden nachgewiesen werden können.

Eine solche Methode, der Test des carcinoembryonalen Antigens (CEA) - 1965 von GOLD und FREEDMAN entwickelt (47) -, war bei der Diagnose und Rezidiverkennung verschiedener Typen maligner Tumoren, besonders des colo-rectalen Carcinoms, hilfreich.

1973 wurde von VINCENT und CHU der CEA-Test als "biologischer Marker" für das Bronchialcarcinom und das Ausmaß seines Wachstums erkannt. Das CEA hat sich bei diesen Untersuchungen auch als nützlicher Marker für die erfolgreiche Resektion und eine angemessene Chemo- oder Radio-Therapie herausgestellt (132). SHUSTER et al. fanden 1973 Differenzen im Sialinsäuregehalt als ein Unterscheidungskriterium für zwei verschiedene Typen von CEA. Dabei wird das CEA mit dem höheren Sialinsäuregehalt langsamer von der Leber aus der Zirkulation genommen. Dies geschieht in Übereinstimmung damit, daß die Sialinsäure das Glykoprotein "maskiert" gegenüber dem Rezeptor der Hepatocyten, der vermutlich eine Sialyltransferase ist (116).
Bestimmte Sialinsäure-haltige Glykoproteine des Serums sind bei pathologischen Prozessen erhöht. Diese Veränderungen können auf einfache Weise durch die Bestimmung der Sialinsäuren (praktisch alle sind N-acetylneuraminsäure) im Serum der Patienten verfolgt werden. Diese Sialoglykoproteine werden auch "acute phase"-Proteine genannt, da sie Korrelationen zwischen Tumorbefall und Immunkompetenz bei Krebspatienten zeigen. Sie sind ideale "biologische Marker".

Für den Nachweis der Sialinsäure in biologischem Material sind viele Methoden entwickelt worden (136): 1941 von KLENK das Orcinol-Verfahren, in den 50er-Jahren von SVENNERHOLM das Resorcinol-Verfahren, dann das Diphenylamin-Verfahren, die direkte-EHRLICH-Methode, das Tryptophan-Perchlorsäure-Verfahren, die Hydrochlorsäure- und Schwefel-Essigsäure-Methode. Die meisten dieser Methoden sind Modifikationen von Tests, die früher für den Nachweis von anderen Kohlenhydraten angewandt wurden. Sie sind nicht nur relativ unempfindlich, sondern können auch nicht für die di-

rekte Messung der Sialinsäure in biologischen Materialien verwendet werden.
Mit dem Thio-Barbitursäure-Test(TBS) nach WARREN (1959) (136) und AMINOFF (1961) stehen heute zwei Methoden zur Verfügung, die gegenüber den früheren wesentlich (12-fach) empfindlicher sind und die direkte Analyse der freien Sialinsäure in Gewebehydrolysaten erlauben.
1973 wurde von GERBAUT et al. (42) der TBS-Test nach AMINOFF einem vollautomatisierten System angepaßt, der die Säurehydrolyse mit einschließt und die Extraktion des Chromogens in ein organisches Lösungsmittel vermeidet. Mit diesem vollautomatischen System können in einer Stunde 30 Proben analysiert werden, wodurch der Sialinsäurenachweis routinemäßig durchführbar wird.
1976 haben HAMMOND und PAPERMASTER einen fluorometrischen Test der Sialinsäure im Picomol-Maßstab angegeben (56). Er ist eine Modifikation des TBS-Tests, der die Empfindlichkeit um den Faktor 500 verbessert und noch 32 pmol Sialinsäure nachweisen kann. Damit können auch noch Miniatur-Gewebsproben, wie zum Beispiel Lymphknoten verschiedener Körperstellen bei Mäusen, getestet werden.

Es ist also ein umfangreiches Instrumentarium vorhanden für die Bestimmung der Sialinsäure als "biologischer Marker" und deren Rolle bei physiologischen und pathologischen Vorgängen. Dazu tragen auch die vorliegenden Ergebnisse bei.

Die erhöhte Konzentration der Sialinsäure im Serum von Patienten mit malignen Erkrankungen, wie Carcinom und Lymphom, ist übereinstimmend mit anderen Untersuchungen (s.S.43). Dafür gibt es verschiedene Erklärungen:

Infolge der Zusammenhänge zwischen Sialinsäurekonzentration und Immunogenität wird angenommen, daß Sialinsäure-haltige Glykoproteine vom Tumor in die Zirkulation sezerniert werden (WATKINS) (140). Es können dies tumorspezifische oder embryonale (wie das CEA) Glykoproteine sein, die von den Tumorzellen gebildet werden und gegen die der Körper keine oder ungenügende Immunkompetenz besitzt. So wird von LIPTON et al.(1978) aufgrund von Untersuchungen der Serum-Proteine und Serum-Sialinsäure bei gesunden Kontrollen, Patienten mit nicht-malignen Erkrankungen und Patienten mit metastasierendem Carcinom ein bisher noch nicht beschriebenes, Sialinsäure-haltiges Glykoprotein angegeben, das aus den Tumorzellen stammt (85).
Chromatographische Untersuchungen von Gewebe menschlicher Bronchialcarcinome ergaben 2-4-fachen Sialinsäuregehalt. Diese Ergebnisse von BRYANT et al. (1974) werden als Anzeichen dafür gewertet, daß Tumorzellen ein Glykoprotein synthetisieren, welches von normalen Zellen nicht oder in geringerem Maß produziert wird. Dieses Sialoglykoprotein könnte dem Glykoprotein ähnlich sein, welches mit der Oberflächenmembran von Colon-Tumorzellen verbunden ist und immunologisch als CEA erkannt wurde, zumal da das CEA auch im Serum von Patienten mit Bronchial-carcinom entdeckt worden ist (18).
Daraus werden auch Folgerungen für eine Therapie der Tumor-bedingten Immunparalyse gezogen. Die Abspaltung der Sialinsäure mit Neuraminidase kann die Immunogenität des Tumorgewebes erhöhen (SEDLACEK,1977) (114). Ein Neuraminidase-ähnlicher Effekt wurde neulich auch für Vitamin A beschrieben (HOGAN-RYAN, 1978) (62). Eine Verbesserung der Immunkompetenz ist auch nach chirurgischer Tumortherapie beobachtet worden (WILKINS et al., 1977) (151).

Eine andere Erklärung für die erhöhte Sialinsäurekonzentration im Serum gibt eine Veränderung der Aktivität der Sialyltransferase bei transformierten Zellen. Dieses Enzym überträgt Sialinsäure-Reste vom Nucleotid CMP-Sialinsäure auf Glykoprotein-Akzeptoren, wodurch das Sialoglykoprotein "maskiert" wird, für die Hepatocyten nicht erkennbar ist und dadurch seine Halbwertszeit verlängert wird (74,121,137). Die Serum-Sialyltransferase wird entweder von Tumorzellen sezerniert oder bei deren Abbau freigesetzt (76). Neuere Untersuchungen der Sialinsäure und Sialyltransferase von SILVER et al.1978 (117) bei 25 Patienten mit malignem Melanom zeigen Beziehungen zwischen Sialyltransferase und malignem Melanom im fortgeschrittenen, metastasierenden Stadium.

Eine weitere Erklärung für die Sialinsäure-Erhöhung, speziell beim Bronchialcarcinom, geben die Beobachtungen über eine abnorme, Sialinsäure-haltige Amylase, die von diesem Tumor produziert wird. SUDO und KANNO berichteten 1976 über einen Patienten mit Adeno-Carcinom der Lunge und Serum-Amylase-Werten von 400-1000 I.E./l (Normalwert: 40-90 I.E./l). Die Amylase im Speichel und im Pankreassaft enthielt keine Sialinsäure-Reste (125).

KERÄNEN et al. fanden bei 25 Magen- und 11 Colon-Adenocarcinomen eine 4- , beziehungsweise 2-fache Erhöhung der proteingebundenen Sialinsäure. Sie vermuteten, daß bei Schleim-sezernierenden Zellen ein Block im Sekretionsmechanismus zu erhöhten Sialoglykoprotein- und damit zu erhöhten Sialinsäurekonzentrationen führt (73). Ein ähnlicher Vorgang könnte sich auch in der Bronchialschleimhaut abspielen.

Insgesamt zeigen die unterschiedlichen Hypothesen und Versuche, die Sialinsäureerhöhung bei Malignität zu erklären, noch keine einheitliche Deutung dieses Phänomens. Die Beurteilung von Untersuchungsergebnissen muß sich auf den Einzelfall beschränken und besitzt keine Allgemeingültigkeit.

Die vorliegenden Serienuntersuchungen des "biologischen Markers" Sialinsäure gibt Hinweise auf Zusammenhänge bei neoplastischen Veränderungen, die über die Feststellung maligne - nicht maligne hinausgehen.
So sind die Sialinsäurewerte im Serum der Patienten mit Bronchialcarcinom gegenüber den anderen malignen Erkrankungen (Mamma-, Collum-, Corpus-Carcinom, HODGKIN-Lymphom, Non-HODGKIN-Lymphom)signifikant erhöht ($p<0,0001$); siehe Tabellen 5 und7, sowie Abb.9. Sobald jedoch das Mamma-Carcinom Lungenmetastasen gesetzt hat, erreicht die Sialinsäure den hohen Wert der Bronchial-Carcinome(Tab.5, Tab.7, Abb.9).
Diese Ergebnisse zeigen eine Sonderstellung der malignen Erkrankungen der Lunge. Die möglichen Gründe dafür wurden auf Seite 47 angedeutet.

In der Arbeit von KROLIKOWSKI et al. (1976) (82), konnten wegen der geringen Zahl der Patienten mit Bronchial-Carcinom keine Aussagen über Beziehungen zwischen Sialinsäurekonzentration und histologischer Klassifizierung dieses Carcinoms gemacht werden. Unsere Ergebnisse bei einer großen Patientenzahl zeigen eine signifikante Erhöhung der Konzentration der Sialinsäure im Serum von Patienten mit Plattenepithelcarcinom und großzelligem Carcinom gegenüber dem kleinzelligen Bronchial-Carcinom - beim Vergleich aller Einzelwerte (Tab.3, Abb.6). Gegenüber dem Adeno-Bronchial-Carcinom waren die Unterschiede nicht signifikant. Untersuchungsergebnisse von BRYANT et al.

(1976) der Sialinsäurekonzentration in tumorösem Lungengewebe (in µmol/mg Protein) zeigen die geringsten Werte beim Adeno-Carcinom (18).
Da wir nur 8 Patienten mit Adeno-Bronchialcarcinom untersuchten, könnten Tests bei einer größeren Patientenzahl auch hier eine signifikante Differenz ergeben.

In vielen Studien sind Beziehungen zwischen Sialinsäurekonzentration und Ausmaß des Tumorbefalls festgestellt worden (78,82,85,117,139,142,151). Damit stimmt die signifikante Erniedrigung ($p<0,001$) der Sialinsäurewerte bei Patienten mit operiertem Plattenepithel-Bronchialcarcinom gegenüber nicht-operierten Patienten überein (Tab.4, Abb.6), wenn man die 45 Einzelwerte, die bei 17 Patienten gemessen wurden, heranzieht. Das Ergebnis ist ein Beispiel dafür, daß der Test des "biologischen Markers" Sialinsäure eine Kontrollmöglichkeit bietet für Tumorgröße und Tumorausbreitung, sowie für den Verlauf nach operativer Therapie oder während Chemotherapie und Strahlenbehandlung.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen auch signifikant erhöhte Sialinsäurewerte bei Patienten mit nichtmalignen Lungenerkrankungen gegenüber der gesunden Kontrollgruppe ($p<0,0001$); siehe Tab.6, Abb.8.
WATKINS (1974) berichtet über gleiche Ergebnisse bei Patienten mit Lungeninfektionen und Tuberkulose (140).
Die Untersuchungen von KROLIKOWSKI et al. (1976) ergaben demgegenüber bei 6 Patienten mit chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen keinen signifikanten Anstieg. Das mag jedoch mit der geringen Anzahl der Probanden zusammenhängen. In dieser Studie wurde bei 6 Rauchern ebenfalls kein Anstieg der Sialinsäurekonzentration festgestellt.

Die Resultate lassen deutlich erkennen, daß durch die Analyse der serumgebundenen Sialinsäure, eines "biologischen Markers", wertvolle Hinweise auf die Malignität einer Erkrankung gewonnen werden können. Insbesondere ist es möglich, neoplastische Veränderungen der Lungen von anderen malignen Erkrankungen zu unterscheiden.
Außerdem kann von der Sialinsäurekonzentration im Serum auf das Ausmaß malignen Wachstums und möglicherweise auf den histologischen Carcinom-Typ geschlossen werden.

Da seit einigen Jahren der Thiobarbitursäure-Test mit geringen Modifikationen in einem vollautomatisierten System durchgeführt werden kann (42), ist die Sialinsäurebestimmung im Serum bei einer großen Zahl von Patienten rasch und auf einfache Weise möglich. So könnte der Nachweis dieses "biologischen Markers" bei der Früherkennung und Differentialdiagnose bösartiger Tumoren von Nutzen sein.

Weitere lohnende Untersuchungen der serumgebundenen Sialinsäure während der Strahlentherapie, Chemotherapie und nach chirurgischer Tumorbehandlung sollten angestellt werden. Sie könnten den Wert der Sialinsäuremessung als Methode zur Überwachung der Effizienz verschiedener Behandlungsmöglichkeiten feststellen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit untersucht die Konzentration der Sialinsäure im Serum von Patienten mit Bronchialcarcinom, anderen malignen Erkrankungen (Mamma-, Collum-, Corpus-Carcinom, HODGKIN-Lymphom, Non-HODGKIN-Lymphom) und nicht-malignen Lungenerkrankungen (Lungentuberkulose und chronisch obstruktive Lungenkrankheiten).
Es wurde geprüft, ob in der Messung der serumgebundenen Sialinsäure, einem "biologischen Marker", eine Möglichkeit zur Früherkennung und Überwachung des Bronchialcarcinoms besteht.

Der Mittelwert von 162 Patienten mit Bronchial-Carcinom beträgt: 3,4493 ± 0,7431 µmol/ml Serum und ist statistisch signifikant erhöht gegenüber dem Mittelwert von 98 gesunden Kontrollpersonen (2,3357 ± 0,3218 µmol/ml), 88 Patienten mit nicht-malignen Lungenerkrankungen (2,733 ± 0,648 µmol/ml), 128 Patienten mit Mamma-Carcinom ohne Lungenmetastasen (2,7763 ± 0,4412 µmol/ml), 28 Patienten mit Collum-Carcinom (2,9541 ± 0,4358 µmol/ml), 11 Patienten mit Corpus-Carcinom (2,9356 ± 0,3311), 14 Patienten mit HODGKIN-Lymphom (2,9408 ± 0,4262 µmol/ml) und 17 Patienten mit Non-HODGKIN-Lymphom (2,7974 ± 0,3080 µmol/ml).

34 Patientinnen mit Mamma-Carcinom und Lungenmetastasen zeigten nahezu gleich hohe Werte wie die Patienten mit Bronchial-Carcinom, nämlich 3,4408 ± 0,7032µmol/ml.

Aus diesen Ergebnissen ist ersichtlich, daß durch den Sialinsäure-Test maligne Erkrankungen der Lunge von anderen malignen Erkrankungen abgegrenzt werden können.

Da bei 145 Patienten mit Bronchial-Carcinom eine

histologische Klassifizierung möglich war, wurden die Unterschiede der Sialinsäurekonzentration bei den vier verschiedenen Zelltypen (Plattenepithel-Carcinom, großzelliges Carcinom, kleinzelliges Carcinom und Adeno- Carcinom) verglichen. Plattenepithel- und großzelliges Carcinom waren gegenüber dem kleinzelligen Carcinom signifikant erhöht, gegenüber dem Adeno-Carcinom war kein signifikanter Anstieg festzustellen.

Innerhalb der anderen malignen Erkrankungen gab es keine signifikanten Differenzen.
Die Sialinsäurekonzentration im Serum von Patienten mit Lungentuberkulose (2,737 ± 0,714 µmol/ml) und chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen (2,691 ± 0,595 µmol/ml) zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. ABERCROMBIE, M., and AMBROSE, E.J.: The surface properties of cancer cells: A review.
Cancer Res. 22: 525 (1962)

2. ABERCROMBIE, M.: Exchanges between cells. In: W. D. McELROY and B.GLASS (eds.), The chemical basis of development, pp.318-328. Baltimore: The John Hopkins Press (1958).

3. ABRAMSON, H.A.: The electrical change of the blood cells of the horse and its relation to the inflammatory process.
The Darwin Press, New Bedford, Mass. 1: 92 (1933)

4. ADA, G.L., and STONE, J.D.: Electrophoretic studies of virus red cell interaction: Mobility gradient of cells treated with viruses of the influenza group and the receptor-destroying enzyme of v. cholerae.
Br. J. Exp. Pathol. 31: 263-274 (1950)

5. ADA, G.L., and FRENCH, E.L.: Purification of bacterial neuraminidase (receptor-destroying enzyme).
Nature (London) 183: 1740-1741 (1959)

6. AMBROSE, E.J.: The surface properties of tumour cells.In: AMBROSE, E.J., and ROE, F.J.C. (eds.): The biology of cancer. p65, London, Van Nostrand (1966)

7. ANDREWS, A.T., HERRING, G.M., KENT, P.W.: Some studies on the composition of bovine cortical-bone sialoprotein.
Biochem. J. 104: 705 - 715 (1967)

8. BAKER, B.J., and HUMPHREYS, T.: Turnover of molecules which maintain the normal surfaces of contact - inhibited cells
Science 175: 905 - 906 (1972)

9. BHAVANANDAN, V.P.,and MEYER, K.: Studies on keratosulfate. Methylation, desulfation and acid hydrolysis studies on old human rib cartilage keratosulfates.
J. Biol. Chem. 243: 1052 - 1059 (1968)

10. BLIX, F. G., GOTTSCHALK, A., and KLENK,E.: Proposed nomenclature in the field of neuraminic and sialic acids.
Nature (London) 179: 1088 (1957)

11. BLUMBERG, B.S., and WARREN, L.: The effect of sialidase on tansferrins and other serum proteins.
Biochim. Biophys. Acta 50: 90 - 101 (1961)

12. BLUMENFELD, O.: The proteins of the erythrocyte membrane obtained by solubilization by aqueous pyridine solution.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 30: 200 - 205 (1968)

13. BOHN, B., THIES, C., and BROSSMER, R.: Cell surface charge, sialic acid content and metabolic behaviour of two tumour sublines. A comparative study.
Eur. J. Cancer 13: 1145 - 1150 (1977)

14. BRAY, B.A., and LAKI, K.: Glycopeptides from fibrinogen and fibrin.
Biochemistry 7: 3119 - 3126 (1968)

15 BREW, K., and VANAMAN, T.C.: The role of α-lactalbumin and the A protein in lactose synthetase: a unique mechanism for the control of a biological reaction.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 59: 491 - 497 (1968)

16. BRINCKERHOFF, C.E., and LUBIN, M.: Sialic acid-deficient tumor cells: Inhibition of sialoglycoprotein synthesis by Emetine.
J. Nat. Cancer Inst. 53: 567 - 572 (1974)

17. BRUNNGRABER, E.G., and BROWN, B.D.: Preparation and properties of sialomucopolysaccharides obtained from rat brain.
Biochem. J. 103: 65 - 72 (1967)

18. BRYANT, M.L., and STONER, G.D., and METZGER, R.P.: Protein-bound carbohydrate content of normal and tumorous human lung tissue.
Biochim. Biophys. Acta 343: 226 - 231 (1974)

19. BURGER, M.M.: The significance of surface structure changes for growth control under crowded conditions. In: G.E.W. WOLSTENHOLME and J. KNIGHT, (eds.): Growth control in cell cultures, pp. 45 - 69. Edinburgh, Churchill Livingstone (1971)

20. BURNET, F.M., McCREA, J.F., and STONE, J.D.: Modification of human red cells by virus action, receptor gradient for virus action in human red cells.
Br. J. Exp. Pathol. 27: 228 - 236 (1946)

21. CARLSON, D.M.: Structure and immunochemical properties of oligosaccharides isolated from pig submaxillary mucins.
J. Biol. Chem. 243: 616 - 626 (1968)

22. CARO, L.G., and PALADE, G.E.: Protein synthesis, storage and discharge in the pancreatic exocrine cell: an autographic study.
J. Cell. Biol. 20: 473 - 495 (1964)

23. CHANDRASEKHAR, N., and WARREN, L., OSBAHR, A.J. et al.: Role of sialic acid in fibrinogen.
Biochim. Biophys. Acta 63: 337 - 339 (1962)

24. CHANDRASEKHAR, N., and LAKI,K.: Fibrin clot formation and the release of carbohydrate.
Biochim. Biophys. Acta 93: 392 - 397 (1964)

25. CLAMP, J.R., and PUTNAM,F.H.: The carbohydrate prosthetic group of human γ-globulin.
J. Biol. Chem. 239: 3233 - 3240 (1964)

26. CONSTANTOPOULOS, A., and NAJJAR, V.A.: The requirement for membrane sialic acid in the stimulation of phagocytosis by the natural tetrapeptide, tuftsin.
J. Biol. Chem. 248: 3819 - 3822 (1973)

27. COOK, G.M.W., HEARD, D.H., and SEAMAN, G.V.F.: Sialic acids and the electrocinetic charge of the human erythrocyte.
Nature (London) 191: 44 - 47 (1961)

28. CORMACK, D.: Effect of enzymatic removal of cell surface sialic acid on the adherence of Walker 256 tumor cells to mesothelial membrane.
Cancer Res. 30: 1459 - 1466 (1970)

29. CURRIE, G.A.: Masking of antigens on the Landschütz ascites tumor.
Lancet 2: 1336 (1967)

30. DAWSON, G., and CLAMP, J.R.: Investigations on the oligosaccharide units of an A myeloma globulin.
Biochem. J. 107: 341 - 352 (1968)

31. de DUVE, C.: The separation and characteization of subcellular particles.
Harvey Lec. 59: 49 - 87 (1965)

32. DUNN, J.T., and SPIRO, R.G.: The α_2-macroglobulin of human plasma. II. Studies on the carbohydrate units.
J. Biol. Chem. 242: 5556 - 5563 (1967)

33. ECOBICHON, D.J., and KALOW, W.: The effect of sialidase on pseudocholinesterase types.
Canad. J. Biochem. 41: 969 -974 (1963)

34. EMMELOT, P., BOS, C.J., BENEDETTI, E.L., et al.: Studies on plasma membranes. I. Chemical composition and enzyme content of plasma membranes isolated from rat liver. Biochim. Biophys. Acta. 90: 126 - 145 (1964)

35. EMMELOT, P.: Biochemical properties of normal and neoplastic cell surfaces, a review. European J. Cancer 9: 319 - 333 (1973)

36. EYLAR, E., MACLOFF, M.A., BRODY, O.V., et al.: The contribution of sialic acid to the surface charge of the erythrocyte. J. Biol. Chem. 237: 1992 - 2000 (1962)

37. FISHER, R.A., and YATES, F.: Statistical tables for biological, agricultural and medical research. Published by OLIVER and BOYD, Ltd., Edinburgh p. 46, table III (1968)

38. FORRESTER, J.A., AMBROSE, E.J., STOKER, M.G.P.: Microelectrophoresis of normal and transformed clones of hamster kidney fibroblasts. Nature (London) 201: 945 - 946 (1964)

39. FOX, T.O., SHEPPARD,J.R., and BURGER, M.M.: Cyclic membrane changes in animal cells: Transformed cells permanently display a surface architecture detected in normal cells only during mitosis. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68: 244 - 247 (1971)

40. GASIC, G., and GASIC, T.: Removal of PAS-positive surface sugars in tumor cells by glycosidases. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 114: 660-663 (1963)

41. GASIC, G., and GASIC, T.: Removal of sialic acid from the cell coat in tumor cells and vascular endothelium and its effect on metastasis. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 48: 1172-1177 (1962)

42. GERBAUT, L., REY, E., and LOMBART, Ch.: Improved automated determination of bound n-acetyl neuraminic acid in serum. Clin. Chem. 19: 1285 - 1287 (1973)

43. GERBECK, C.M., BEZKOROVANIY, A., RAFELSON,M.E.: Glycopeptides obtained from human haptoglobin 2-1 and 2-2. Biochemistry 6: 403 - 411 (1967)

44. GESNER, B.M., and GINSBURG, V.: Effect of glycosidases on the fate of transfused lymphocytes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 52: 750-755 (1964)

45. GLICK, M.C., and BUCK, C.A.: Glycoproteins from the surface of metaphase cells. Biochemistry 12: 85 - 90 (1973)

46. GLICK, J.L., and GITHENS, S.: III. Role of sialic acid in potassium transport of L 1210 leukemic cells. Nature (London) 208: 88 (1965)

47. GOLD, P., and FREEDMAN, S.: Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. J. Exp. Med. 121: 439 - 462 (1965)

48. GOTTSCHALK, A., WHITTEN, W.K., GRAHAM, E.R.G.: Inactivation of follicle-stimulating hormone by enzymatic release of sialic acid. Biochim. Biophys. Acta. 38: 183-184 (1960)

49. GOTTSCHALK, A.: Correlation between composition, structure, shape and function of a salivary mucoprotein. Nature (London) 186: 949-951 (1960)

50. GOTTSCHALK,A.: Neuraminidase: the specific enzyme of influenza virus and vibrio cholerae. Biochim. Biophys. Acta 23: 645-646 (1957)

51. GOVERDE, B.C., VEENKAMP, F.J.N., HOMAN, J.D.H.: Studies on human chorionic gonadotropin. II. Chemical composition and its relation to biological activity.
Acta Endocr. (Kobenhavn) 59: 105-119 (1968)

52. GRAHAM, E.R.B., and GOTTSCHALK, A.: Studies on mucoproteins. I. The structure of the prosthetic group of ovine submaxillary gland mucoprotein.
Biochim. Biophys. Acta 38: 513-524 (1960)

53. GREGORIADIS, G., MORELL, A.G., STERNLIEB, J., and SCHEINBERG, J.H.: Catabolism of desialylated ceruloplasmin in the liver.
J. Biol. Chem. 245: 5833 (1970)

54. GROLLMAN , A.P., and MARCUS, D.M.: Enzymatic incorporation of fucose into blood group H - substance.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 25: 542-548 (1966)

55. HAKOMORI, S., and MURAKAMI, W.T.: Glycolipids of hamster fibroblasts and derived malignant-transformed cell lines.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 59: 254- 261 (1968)

56. HAMMOND, K.S., and PAPERMASTER, D.S.: Fluorometric assay of sialic acid in the picomole range: a modification of the thiobarbituric acid assay.
Analyt. Biochem. 74: 292-297 (1976)

57. HAYWOOD, G., and McKHANN, C.F.: Antigenic specifities on murine sarcoma cells. Reciprocal relationship between normal transplantation antigens, (H-2) and tumor-specific immunogenicity.
J. Exp. Med. 133: 1171-1187 (1971)

58. HEARN, V.M., SMITH, Z.G., WATKINS, W.W.: An α-N-acetyl-D-galactosaminyl-transferase associated with the human blood group A character. Biochem. J. 109: 315-317 (1968)

59. HEIDE, K.: The significance of sialic acid in serum glycoproteins. Behring Inst. Mitt. 55: 168-176 (1974)

60. HEIJLMAN, J.and ROUKEMA, P.A.: Isolation of sialomucopeptides from human brain. Biochem. Biophys. Acta 127: 269-271 (1966)

61. HILDEBRAND, J., STRYCKMANS, P.A., and VANHOUCHE,J.: Gangliosides in leukemic and non-leukemic human leukocytes. Biochim. Biophys. Acta 260: 272-278 (1972)

62. HOGAN-RYAN, A., and FENNELLY, J.J.: Neuraminidase-like effect of vitamin A on cell surface. Eur. J. Cancer 14: 113-116 (1978)

63. ISHIHARA, K., and SCHMID, K.: The size, composition and amino acid sequence of certain glycopeptides of human plasma: Ba-α_2-glycoprotein. Biochim. Biophys. Acta 133: 56-64 (1967)

64. JAMIESON, G.A.: Studies on glycoproteins. II. Isolation of the carbohydrate chain of human transferrin. J. Biol. Chem. 240: 2914- 2920 (1965)

65. JAMIESON, G.A.: Studies on glycoproteins. I. The carbohydrate portion of human ceruloplasmin. J. Biol. Chem. 240: 2019-2027 (1965)

66. KAMAT, V.B., and WALLACH, D.F.H.: Separation and partial purification of plasma membrane fragments from Ehrlich ascites carcinoma microsomes. Science 148: 1343- 1345 (1965)

67. KAFKA,V., and MUSIL, J.: The use of serial determination of blood serum glycoproteins for indirect evidence of the sensitivity and resistance of malignant tumor cells to clinical chemotherapy.
Neoplasma (Bratisl.) 24: 101-107 (1977)

68. KARLSON, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler.
Georg Thieme Verlag, Suttgart. 4. Auflage 1964,pp. 236-237.

69. KATHAN, R.N., and ADAMANY, A.: Comparison of human MM, NN, and MN blood group antigens.
J. Biol. Chem. 242: 1716-1722 (1967)

70. KATHAN, R.N., WINZLER, R.J., and JOHNSON,C.A.: Preparation of an inhibitor of viral hemagglutination from human erythrocytes.
J. Exp. Med. 113: 37-45 (1961)

71. KEMP, R.B.: Effect of the removal of cell surface sialic acid on cell aggregation in vitro.
Nature (London) 218: 1255 (1968)

72. KENT, P.W., and ALLEN, A.: The biosynthesis of intestinal mucins. The effect of salicylate on glycoprotein biosynthesis by sheep colonic and human gastric mucosal tissue in vitro.
Biochem. J. 106: 645-658 (1968)

73. KERÄNEN, A., LEMPINEN, M., and PURO, K.: Ganglioside pattern and neuraminic acid content of human gastric and colonic carcinoma.
Clin. Chim. Acta 70: 103-112 (1976)

74. KESSEL, D., and ALLEN, J.: Elevated plasma sialyltransferase in the cancer patient.
Cancer Res. 35: 670-672 (1975)

75. KHADAPKAR, S.V., SHET, N.A., and BHIDE, S.V.: Independence of sialic acid levels in normal and malignant growth.
Cancer Res. 35: 1520-1523 (1975)

76. KIM, Y.S., PERDOMO, J., BELLA,A.Jr., NORDBERG, J.: Properties of A-CMP-N-acetylneuraminic acid: Glycoprotein sialyltransferase in human serum and erythrocyte membranes.
Biochim. Biophys. Acta 244: 505-512 (1971)

77. KLENK, E.: Neuraminic acid. In: The chemistry and biology of mucopolysaccharides.
WOLSTENHOLME, G.E., and O`CONNOR, M. (eds.)
London, Churchill (1958) pp. 296-311

78. KLOPPEL, T.M., KEENAN, T.W., FREEMAN, M.J.,and MORRE, D.J.: Glycolipid bound sialic acid in serum: Increased levels in mice and humans bearing mammary carcinoma.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74: 3011-3013 (1977)

79. KOBATA, A., GROLLMAN, E.F., and GINSBURG, V.: An enzymatic basis for blood type B in humans.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 32: 272-277 (1968)

80. KOBATA, A., GROLLMAN, E.F., and GINSBURG, V.: An enzymatic basis for blood type A in humans.
Arch. Biochem. 124: 609-612 (1968)

81. KORNFELD, S., KORNFELD, R.N., and NEUFELD, E.F., et al.: The feedback control of sugar nucleotid biosynthesis in liver.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 52: 371-379 (1964)

82. KROLIKOWSKI, F.J., REUTER, K., WAALKES, T.P., SIEBER, S.M., and ADAMSON, R.H.: Serum sialic acid levels in lung cancer patients.
Pharmacology 14: 47-51 (1976)

83. LICHTMAN, M.A., and WEED, R.I.: Electrophoretic mobility and N-acetylneuraminic acid content of human normal and leukemic lymphocytes and granulocytes.
Blood 35: 12-22 (1970)

84. LILLIE, R.D.: Histochemistry of connective tissues: collagen, reticulum, basement membranes, sarcolemma, ocular membranes.
Lab. Invest. 1: 30-45 (1952)

85. LIPTON, A., HARVEY, H. DeLONG, S., WHITE, D., ALLEGRA,M., and DAVIDSON,E.: Elevated glycoprotein levels in cancer sera.
Proc. Am. Assn. Cancer Res. 315: Abstr. No. c-34 (1978)

86. MARGOLIS, F., and FEIGELSON, P.: Atropinesterase, a sialoprotein.
Biochim. Biophys. Acta 89: 357-360 (1964)

87. MARSHALL, W.E., and KUMMEROW, F.A.: The carbohydrate constituents of human serum β-lipoprotein: galactose, mannose, glucosamin, and sialic acid.
Arch. Biochem. 98: 271-273 (1962)

88. MATSUMOTO, M. TAKI, T., and KOJIMA, K.: Study on sialic acid-containing glycolipid in rat ascites hepatoma cells.
Japan J. Exp. Med. 46: 135-138 (1976)

89. McCLELLAND, D.A., and BRIDGES, J.M.: The total N-acetyl-neuraminic acid content of human normal and lymphatic leukaemic lymphocytes.
Br. J. Cancer 27: 114 (1973)

90. MONTREUIL, J., BISERTE, G., STRECKER, G., et al.: Description d'un nouveau type de méliturie: la sialurie.
C. R. Acad. Sci.(D), (Paris) 265: 97-99 (1967)

91. MORELL, A.G., GREGORIADIS, G., SCHEINBERG, I.H., HICKMAN, J., and ASHWELL, G.: The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation.
J. Biol. Chem. 246: 1461-1467 (1971)

92. MORELL, A.G., IRVINE, R.A., STERNLIEB,J., SCHEINBERG, I.H., and ASHWELL, G.: The effect of enzymatic removal from ceruloplasmin on the serum survival time.
J. Biol. Chem. 243: 155 (1968)

93. MORI, K.F.: Antigenic structure of human gonadotropins, contribution of carbohydrate moiety to the antigenic structure of pituitary follicle-stimulating hormone.
Endocrinology 85: 330 (1969)

94. MULDOON, T.G., and WESTPHAL, U.: Steroid-protein interactions. XV. Isolation and characterization of corticosteroid-binding globulin from human plasma.
J. Biol. Chem. 242: 5636-5643 (1967)

95. NADLER, N. J., YOUNG, B. A., LEBLOND, C. P., et al.: Elaboration of thyroglobulin in the thyroid follicles.
Endocrinology 74: 333-354 (1964)

96. NEUTRA, M., and LEBLOND, C. P.: The Golgi apparatus.
Sci. Amer. 220: 100-107 (1969)

97. OHTA, N., PARDEE, A. B., McAUSLAN, B.R., et al.: Sialic acid contents and controls of normal and malignant cells.
Biochim. Biophys. Acta 158: 98-102 (1968)

98. PATTERSON, M.K.Jr., and TOUSLER, O.: Intracellular distribution of sialic acid and its relationship to membranes.
Biochim. Biophys. Acta 56: 626-628 (1962)

99. PETHICA, B.A., and BOUGHAM, A.D.: The adhesivness of cells and the nature of the chemical groups at their surfaces.
Proc. Roy. Phys. Soc. (Edinburgh) 28: 43 (1960)

100. PRAT, M., and COMOGLIO, P.M.: Involvement of sialic acids in the immunological specifity of plasma membrane glycoproteins.
Immunochemistry 13: 97-102 (1976)

101. PRICER, W.E.Jr., and ASHWELL, G.: The binding of desialylated glycoproteins by plasma membranes of rat liver.
J. Biol. Chem. 246: 4825-4833 (1971)

102. PURDON, L., AMBROSE, E.J., and KLEIN, G.:
A correlation between electrical surface charge and some biological characteristics during the stepwise progression of a mouse sarcoma.
Nature (London) 181: 1586-1587 (1958)

103. RAMBOURG, A., HERNANDEZ, W., and LEBLOND, C.P.: Detection of complex carbohydrates in the Golgi apparatus of rat cells.
J. Cell. Biol. 40: 395-414 (1969)

104. RAMBOURG, A., NEUTRA, M, and LEBLOND, C.P.: Presence of a "cell coat" rich in carbohydrates at the surface of cells in the rat.
Anat. Rec. 154: 41-71 (1966)

105. RAMBOURG, A., and LEBLOND, C.P.: Electron microscope observations on the carbohydrate rich cell coat present at the surface of cells in the rat.
J. Cell. Biol. 32: 27-53 (1967)

106. ROBINEAUX, R., and BAZIN, S.: Etude de la mobilité é lectrophorétique des leukocytes humains.
Le Sang 22: 241 (1951)

107. ROSENBERG, S.A., and GUIDOTTI, G.: The protein of human erythrocyte membranes. I. Preparation, solubilization, and partial characterization.
J. Biol. Chem. 243: 1985-1992 (1968)

108. ROSENBERG, S.A., and EINSTEIN, A.B.Jr.: Sialic acids on the plasma membrane of cultured human lymphoid cells.
J. Cell. Biol. 53: 466-473 (1972)

109. RUHENSTROTH-BAUER, G., FUHRMANN, G.F., Gzanzer,E., et al.: Zur Bedeutung der Neuraminsäuren in der Zellmembran für das Wachstum maligner Zellen.
Z. Krebsforsch. 65: 37-43 (1962)

110. RUHENSTROTH-BAUER, G., KÜBLER, W., FUHRMANN, G.F., und RUEFF,F.: Zur Frage spezifischer Strukturelemente in Tumorzellmembranen: ihr Neuraminsäuregehalt.
Klin. Wschr. 39: 764 (1961)

111. SANFORD, B.H.: An alteration in tumor histocompatibility induced by neuraminidase.
Transplantation 5: 1273 (1967)

112. SATAKE, M., OKUYAMA, T., ISHIHARA, K., et al.: The carbohydrate polypeptide linkages, the amino acid sequences of the peptides adjacent to some of these bonds, and the composition and size of the carbohydrate units of α_1-acid glycoprotein.
Biochem. J. 95: 749-757 (1959)

113. SCHOENMAKERS, J.G.G., MATZE, R., HAANEN, C., et al.: Hageman factor, a novel sialoglycoprotein with esterase activity.
Biochim. Biophys. Acta 101: 166-176 (1965)

114. SEDLACEK, H.H., SEILER, F.R., and SCHWICK, H.G.: Neuraminidase and tumor immunotherapy.
Klin. Wschr. 55: 199-214 (1977)

115. SHEN, L., GROLLMAN, E.F., and GINSBURG, V.: An enzymatic basis for secretor status and blood group substance specifity in humans.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 59: 224-230 (1968)

116. SHUSTER, J., SILVERMAN, M., and GOLD, P.: Metabolism of human carcinoembryonic antigen in xenogeneic animals.
Cancer Res. 33: 65-68 (1973)

117. SILVER, H.K.B., KARIM, K.A., and ARCHIBALD, E.L.: Serum sialic acid and sialyltransferase as monitors of tumor burden in malignant melanoma patients.
Proc. Am. Assn. Cancer Res. 403: Abstr. No. C-388 (1978)

118. SIMMONS, R.L., ROIS, A., LUNDGREN, G., et al.: Immunospecific regression of methylcholanthrene fibrosarcoma with the use of neuraminidase.
Surgery 70: 38-46 (1971)

119. SIMMONS, R.L., and ROIS, A.: Immunotherapy of cancer. Immunospecific rejection of tumours in recipients of neuraminidase-treated cells plus BCG.
Science 174: 591-593 (1971)

120. SIMMONS, R.L., ROIS, A., RAY, P.K., et al.: Effect of neuraminidase on growth of a 3-methylcholanthrene-induced fibrosarcoma in normal and immunosuppressed syngeneic mice.
J. Natl. Cancer Inst. 47: 1087-1094 (1971)

121. SPATARO, A.C., MORGAN, H.R.,and BOSMAN, H.B.: Cell surface changes accompanying viral transformation: N-acetylneuraminic acid ectotransferase system activity.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 149: 486-490 (1975)

122. SPIRO, R.G.: Studies on fetuin, a glycoprotein of fetal serum. II. Nature of the carbohydrate units.
J. Biol. Chem. 237: 382-388 (1962)

123. SPIRO, R.G.: Glycoproteins: their biochemistry, and role in human disease (first of two parts).
New Engl. J. Med. 281: 991-1001 (1969)

124. SPRINGER, G.F., and ANSELL, N.J.: Inactivation of human erythrocyte agglutinogens M and N by influenza viruses and receptor-destroying enzyme.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 44: 182-188 (1958)

125. SUDO, K., and KANNO,T.: Properties of the amylase produced in carcinoma of the lung.
Clin. Chim. Acta 73: 1-12 (1976)

126. SVENNERHOLM, L.: Quantitative estimation of sialic acids.III. An anion exchange resin method.
Acta Chem. Scand. 12: 547 (1958)

127. SVENNERHOLM, L.: Glycolipids and other amino sugar containing compounds in the nervous system. In: The amino sugars. The chemistry and biology of compounds containing amino sugars. E.A. BALAZS, R.W. JEANLOZ (eds.) Vol. 2 A.
New York, Academic Press, pp.381-400, (1965)

128. SWEELEY, C.C., and DAWSON, G.: Lipids of the erythrocytes. In: Red cell membrane, JAMIESON, G.A., and GREENWALT, T.J. (eds.)
Philadelphia, Lippincott pp. 172-227 (1969)

129. SZEWCZUK, A., and CONNELL, G.E.: The effect of neuraminidase on the properties of γ-glutamyl-transpeptidase.
Biochim. Biophys. Acta 83: 218-223 (1964)

130. VAHERI, A., RUOSLAHTI, E., and NORDLING, S.: Neuraminidase stimulates division and sugar uptake in density-inhibited cell cultures.
Nature (London) 238: 211-212 (1972)

131. van BEEK, W.P., SMETS, L.A., and EMMELOT, P.: Increased sialic acid density in surface glycoprotein of transformed and malignant cells - a general phenomenon?
Cancer Res. 33: 2913-2922 (1973)

132. VINCENT, R.G., and CHU, T.M.: Carcinoembryonic antigen in patients with carcinoma of the lung.
Proc. Am. Assn. Cancer Res. 14:106 (1973)

133. VOGT, P.K.: The cell surface in tumor virus infection.
Cancer Res. 23: 1519-1527 (1963)

134. WALLACH, D.F.H., and KAMAT, V.B.: The contribution of sialic acid to the surface charge of fragments of plasma membrane and endoplasmatic reticulum.
J. Cell. Biol. 30: 660-663 (1966)

135. WARD, P.D., and AMBROSE, E.J.: Electrophoretic and chemical characterization of the charged groups at the surface of murine CL3 ascites leukemia cells.
J. Cell.Sci. 4: 289-298 (1969)

136. WARREN, L.: Thiobarbituric acid assay of sialic acids.
J. Biol. Chem. 234: 1971-1975 (1959)

137. WARREN, L., FUHRER, J.P., and BUCK, C.A.: Surface glycoproteins of normal and transformed cells: a difference determined by sialic acid and a growth-dependant sialyltransferase.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69: 1838-1842 (1972)

138. WARSHAWSKY, H., LEBLOND, C.P., DROZ, B.: Synthesis and migration of proteins in the cells of the exocrine pancreas as revealed by specific activity determination from radioautographs.
J. Cell. Biol. 16: 1-24 (1963)

139. WATKINS, W.M.: Blood group substances.
Science 152: 172-181 (1966)

140. WATKINS, E.Jr.: Neuraminidase accentuation of cancer cell immunogenicity.
Behring Inst. Mitt. 55: 355-370 (1974)

141. WEINSTEIN, D.B., MARSH, J.B., GLICK, M.C., and WARREN, L.: Membranes of animal cells. VI. The glycolipids of the L cell and its surface membrane.
J. Biol. Chem. 245: 3928-3937 (1970)

142. WEISS, J.F., BRADLEY, W.P., CHRETIEN, P.B., KENADY, D.E., BASKIES, A.M.,and MEEKER, W.R.: Sialic acid as a measure of serum levels of acute-phase proteins in cancer patients.
Proc. Am. Assn. Cancer Res. 390, Abstr. No. C-334 (1978)

143. WEISS, L.: Sialic acid as a structural component of some mammalian tissue cell surfaces.
Nature (London) 191: 1108-1109 (1961)

144. WEISS. L.: The cell peripherie.
Int. Rev. Cytol. 26: 63-105 (1969)

145. WEISS, L., HARLOS, J.P.: Short-term interactions between cell surfaces.
Prog. Surface Sci. 1: 355-405 (1971)

146. WEISS, L.: Neuraminidase, sialic acids, and cell interactions.
J. Nat. Cancer Inst. 50: 3-19 (1973)

147. WEISS, L.: Interactions between normal and malignant cells. In: The chemistry of biosurfaces.
HAIR, E. (ed.) Vol. 2 New York, M. Decker
pp. 377-445 (1972)

148. WEISS,L., LEVINSON, C.: Cell electrophoretic mobility and cationic flux.
J. Cell. Physiol. 73: 31-36 (1969)

149. WEISS, L.: Studies on cell deformability.
I. Effect of surface charge.
J. Cell. Biol. 26: 735 (1965)

150. WEISS, L., MAYHEW, E., and ULRICH, K.: The effect of neuraminidase on the phagocytic process in human monocytes.
Lab. Invest. 15: 1304 (1966)

151. WILKINS, S.A.Jr., and OLKOWSKI, Z.L.: Immunological evaluation of patients with adenocarcinoma of the large bowel on immunotherapy.
Am. J. Proctol. 28: 27-34 (1977)

152. WINZLER, R.J.: In vivo metabolism of glycoprotein.
Intrnational conference on cystic fibrosis of the pancreas (mucoviscidosis), 4th, Bern and Grindelwald, 1966.Cystic fibrosis: Proceedings Part 2: Biochemistry of glycoproteins and related substances. E. ROSSI, E. STOLL (eds.)
Basel, S. Karger,pp. 226-242 (1968)

153. WINZLER, R.J., HARRIS, E.D. PEKAS, D.J.,et al.: Studies on glycopeptides released by trypsin from intact human erythrocytes. Biochemistry(Wash.) 6: 2195-2202 (1967)

154. WINZLER, R.J.: Carbohydrates in cell surfaces. Int. Rev. Cytol. 29: 77-125 (1970)

155. WU, H.C., MEEZAN, E., BLACK, P.H., et al.: Comparative studies on the carbohydrate-containing membrane components of normal and virus -transformed mouse fibroblasts. I. Glucosamine-labeling patterns in 3T3, spontaneously transformed 3T3, and SV-40-transformed 3T3 cells. Biochemistry (Wash.) 8: 2509-2517 (1969)

156. YAMASHINA, I., IZUMI, K., OKAWA, H., et al.: Hexosamine and sialic acid in mitochondria and microsome from rabitt liver. J. Biochem. 58: 538.542 (1965)

157. ZIDERMAN, D., GOMPERTZ, S., SMITH, Z.G., et al.: Glycosyltransferases in mammalian gastric mucosal linings. Biochem. Biophys. Res. Comm. 29: 56-61 (1967)

LEBENSLAUF

Am 13. Dezember 1946 wurde ich, Klaus Reiner, als zweiter Sohn des Studienrates Dr. Eugen Reiner und seiner Ehefrau Susanne, geborene Fink, in Tübingen geboren.
Von 1953 bis 1957 besuchte ich dort die Mörike-Volksschule und trat nach bestandener Aufnahmeprüfung im April 1957 in das humanistische Uhlandgymnasium ein, wo ich am 1. März 1966 die Reifeprüfung ablegte.
An der Eberhard-Karls-Universität Tübingen begann ich im Sommersemester 1966 das Zahnmedizinstudium. Ich bestand am 6. Oktober 1967 die naturwissenschaftliche Vorprüfung für Zahnärzte und am 29. März 1969 die zahnärztliche Vorprüfung.
1972 unterbrach ich das Studium und trat 1973 in den Dienst der Bundesanstalt für Flugsicherung ein. An der Flugsicherungsschule in München legte ich 1974 die Laufbahnprüfung für den Flugverkehrskontrolldienst ab. Bis 1976 war ich als Radarlotse bei der Regionalkontrollstelle München tätig.
Vom Sommersemester 1976 bis zum Sommersemester 1978 führte ich an der Philipps-Universität Marburg das Studium der Zahnheilkunde zu Ende. Am 4. Dezember 1978 hatte ich die zahnärztliche Prüfung erfolgreich bestanden. Die Bestallung als Zahnarzt erhielt ich am 27. Dezember 1978.
Die vorliegende Dissertation habe ich im Mai 1977 begonnen und im Februar 1979 zum Abschluß gebracht.

Marburg, im Februar 1979 Klaus Reiner

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

In Marburg: Ahrens, Baltzer, Bernhardt, Bode, Friederich, Fuhrmann, Hennis, Hering, Hilgermann, Janke, Klötzer, Koransky, Lauer, Maroske, Niemeyer, Rupec, Schiff, Schmidt, Schmitz-Moormann.

In Tübingen: Arnold, Bader, Brecht, Bues, Feneis, Fröhlich, Geisbe, Graumann, Grell, Hinrichsen, Hofmann, Körber, Krüger, Kaufmann, Kallee, Mallach, Mörike, Opitz, Pauschinger, Pfeifer, Riethe, Schneider, Schulte, Schwenzer, Weitzel, Winne.